

**Molekularbiologische Untersuchungen
von Nicht-ribosomalen Peptidsynthetase-ähnlichen Enzymen
aus Ascomyceten**

Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Elisabeth Hühner
aus Schwalmstadt

Marburg/Lahn

2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Eingereicht am 23.10.2020

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2020

Hochschulkennziffer: 1180

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor
den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

Marie Curie

Für meine Eltern

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Molekularbiologische Untersuchungen von Nicht-ribosomalen Peptidsynthetase ähnlichen
Enzymen aus Ascomyceten“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Elisabeth Hühner)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Publikationen.....	VI
Abkürzungen	VII
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Naturstoffe und Ascomycota.....	5
1.1.1. Die Gattungen <i>Aspergillus</i> und <i>Chaetomium</i>	6
1.1.1.1. <i>Aspergillus terreus</i>	7
1.1.1.2. <i>Chaetomium globosum</i>	9
1.2. Nicht-ribosomale Peptidsynthasen.....	10
1.2.1. Allgemein.....	10
1.2.2. Adenylierungsdomäne.....	13
1.2.3. Thiolierungsdomäne und Phosphopantetenyltransferasen	15
1.2.4. Kondensierungsdomäne	17
1.2.5. Optionale Domänen	19
1.2.5.1. Thioesterase-Domäne	20
1.2.5.2. Reduktase.....	22
1.2.5.3. Epimerisierungsdomänen	23
1.2.5.4. Methylierungsdomänen	24
1.2.6. Modifikationen von NRPS	24
1.3. Nichtribosomale Peptidsynthetase-ähnliche Enzyme	25
1.3.1. NRPS-ähnliche Carboxylsäure Reduktasen	25
1.3.2. NRPS-ähnliche Enzyme mit einer A-T-TE Architektur.....	26
1.4. Prenyltransferasen	28
1.4.1. Aromatische Prenyltransferasen.....	29
1.4.1.1. Die DMATS Superfamilie	31
2. Zielsetzung	34
3. Materialien und Methoden	36

3.1. Chemikalien, Geräte, Säulenmaterialien für die Chromatographie	36
3.1.1. Chemikalien	36
3.1.2. Geräte	36
3.1.3. Säulenmaterialien für die Chromatographie	37
3.1.4. Kits und Enzyme	38
3.2. Mikroorganismen, Plasmide und Primer	38
3.2.1. Mikroorganismen	38
3.2.2. Plasmide	39
3.2.3. Oligonukleotide	53
3.2.4. Mikroorganismen	58
3.3. Nährmedien und Lösungen	58
3.3.1. Nährmedien	58
3.3.1.1. Nährmedien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	58
3.3.1.2. Nährmedien für die Kultivierung von Ascomyceten	59
3.3.1.3. Medien zur Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
3.3.2. Antibiotika und Auxotropiemarker	60
3.3.3. Lösungen und Puffer	61
3.3.3.1. Lösungen zur Extraktion von DNA	62
3.3.3.2. Puffer zur Detektion von DNA	63
3.3.3.3. Puffer zur Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	63
3.3.3.4. Lösungen und Puffer zur Isolierung und Analyse von Proteinen	64
3.4. Kultivierungsbedingungen	66
3.4.1. Kultivierungsbedingungen für <i>E. coli</i>	66
3.4.2. Kultivierungsbedingungen für Ascomyceten	66
3.4.2.1. Kultivierungsbedingungen für <i>Aspergillus nidulans</i>	66
3.4.2.2. Kultivierungsbedingungen für <i>Aspergillus terreus</i>	66
3.4.2.3. Kultivierungsbedingungen für <i>Chaetomium globosum</i>	66
3.4.2.4. Kultivierungsbedingungen für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.4.3. Herstellung einer Sporensuspension	67
3.5. Methoden der Molekularbiologie	67
3.5.1. Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten	67
3.5.2. Isolierung von mRNA aus <i>A. terreus</i> und cDNA-Synthese	68
3.5.3. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	68
3.5.4. Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	68
3.5.5. Blau-Weiß-Selektion	69
3.5.6. Transformation von Plasmiden in <i>S. cerevisiae</i>	69

3.5.7. Transformation in <i>S. cerevisiae</i> nach der Freeze Methode	70
3.5.8. Protoplastierung und Transformation von <i>A. nidulans</i>	70
3.5.8.1. Protoplastierung.....	70
3.5.8.2. Transformation.....	71
3.5.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	71
3.5.10. Restriktion durch Endonukleasen.....	72
3.5.11. Dephosphorylierung	72
3.5.12. Ligation von DNA-Fragmenten.....	72
3.5.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	73
3.5.14. Homologe Rekombination in <i>E. coli</i> zur Herstellung von Konstrukten	74
3.5.15. Agarose-Gelelektrophorese.....	74
3.5.16. Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA mit Hilfe von Ethanol	75
3.5.17. Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung von DNA	75
3.6. Methoden der Biochemie	75
3.6.1. Gewinnung von Proteinextrakt aus <i>S. cerevisiae</i>	75
3.6.2. Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose.....	76
3.6.3. SDS-PAGE	76
3.6.4. Proteinnachweis mittels Western Blot	76
3.6.4.1. Probenentnahme und Zellaufschluss	77
3.6.4.2. Proteinnachweis.....	77
3.7. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten.....	78
3.7.1. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>S. cerevisiae</i>	78
3.7.2. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus <i>A. nidulans</i>	78
3.7.3. Analytische Methoden.....	79
3.7.3.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)	79
3.7.3.2. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	80
3.7.3.3. Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	81
4. Ergebnisse.....	82
4.1. Untersuchungen von putativen NRPS-ähnlichen Genen aus <i>A. terreus</i> und <i>C.</i> <i>globosum</i>	82
4.1.1. Expressionsversuche von NRPS-ähnlichen Genen mit eigenem Promotor-und Terminatorbereich in <i>A. nidulans</i>	82
4.1.1.1. Einleitung	82
4.1.1.2. Transformation von ATEG_03563 und ATEG_03090 mit ihren Promotor- und Terminatorbereichen in <i>A. nidulans</i> TN02A7.....	83

4.1.1.3. Expression von ATEG_03563 inklusive seiner Promotor und Terminatorsequenz in <i>A. nidulans</i> GR5	86
4.1.1.4. Klonierung und Transformationsversuche von ATEG_08899	89
4.1.1.5. Strategiewechsel und Klonierungsversuche.....	90
4.1.2. Expression der NRPS-ähnlichen Gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
4.1.2.1. Einleitung	93
4.1.2.2. Isolierung von mRNA aus <i>A. terreus</i> und cDNA Synthese	93
4.1.2.3. Amplifikation und Klonierung von <i>apvA</i> und <i>mela</i>	94
4.1.2.4. Amplifikation und Klonierung von <i>pgnA</i>	97
4.1.2.5. Amplifikation und Klonierung von <i>btyA</i>	98
4.1.2.6. Amplifikation und Klonierung von <i>atrA_{At}</i>	99
4.1.2.7. Transformation und Fermentation von <i>S. cerevisiae</i> BJ5464_NpgA	100
4.1.2.8. Isomerisierung von Aspulvinon E	103
4.1.2.9. Strukturaufklärung der Produkte	104
4.1.3. Untersuchungen zu Indolpyruvat aktivierenden putativen NRPS-ähnlichen Enzymen aus <i>Aspergillus terreus</i> und <i>Chaetomium globosum</i>	106
4.1.3.1. Einleitung	106
4.1.3.2. Amplifikation und Klonierung von <i>atqA</i> aus gDNA von <i>A. terreus</i>	107
4.1.3.3. Amplifikation und Klonierung von <i>astA</i> aus gDNA von <i>Chaetomium globosum</i>	107
4.1.3.4. Biotransformationsversuche von Indolpyruvat in dem <i>S. cerevisiae</i> Stamm BJ5464_NpgA bei Zugabe mit AstA	108
4.1.3.5. Produktakkumulation in dem <i>S. cerevisiae</i> Stamm KO3 mit AstA und AtqA	109
4.1.3.6. Strukturaufklärung.....	110
4.1.4. Nachweis der Überproduktion von NRPS-ähnlichen Proteine in <i>S. cerevisiae</i> Kulturen	112
4.1.4.1. Überproduktion und Aufreinigung der NRPS-ähnlichen Protein	117
4.1.4.2. Überprüfung der Aktivität von den NRPS-ähnlichen Enzyme mit einem HIS ₆ -Affinitäts-Tag <i>in-vivo</i>	117
4.1.5. Klonierung der NRPS-ähnlichen Gene und des Phosphopantethenyltransferase Gens NpgA für eine Expression in <i>E. coli</i>	118
4.1.6. Zielgerichteter Austausch von Domänen der NRPS-ähnlichen Enzyme zur Generierung anderer Produkte.....	121
4.1.6.1. Einleitung	121
4.1.6.2. Fusionierung der Domänen aus unterschiedlichen NRPS-ähnlichen Genen mit Hilfe von Klonierung	122
4.1.6.3. Überproduktion der Rekombinations-Enzyme	125
4.1.7. Strukturaufklärung.....	133

4.2. Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus <i>Aspergillus terreus</i> und <i>Chaetomium globosum</i>	137
4.2.1. Einleitung	137
4.2.2. Klonierung.....	138
4.2.3. Co-Transformation von NRPS-ähnlichen mit Prenyltransferasen.....	140
5. Diskussion	142
5.1. Untersuchungen zu putativen NRPS-ähnlichen Genen aus <i>A. terreus</i> und <i>C. globosum</i>	142
5.1.1. Expressionsversuche von putativen NRPS-ähnlichen Genen mit eigenem Promotor- und Terminatorberiche aus <i>A. terreus</i> in <i>A. nidulans</i>	142
5.1.2. Expression von putativen NRPS-ähnlichen Genen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 144	
5.1.2.1. Untersuchungen zu NRPS-ähnlichen Enzymen <i>in vitro</i>	147
5.1.3. Zielgerichteter Austausch der Domänen von NRPS-ähnlichen Enzymen zur Erweiterung der Produktpalette.....	149
5.2. Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus <i>Aspergillus terreus</i> und <i>Chaetomium globosum</i>	151
6. Referenzen	153
7. Anhang.....	173
Danksagung	193

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Elisabeth Hühner, Katja Backhaus, Rixa Kraut and Shu-Ming Li (2018)

Production of α -keto carboxylic acid dimers in yeast by overexpression of NRPS-like genes from *Aspergillus terreus*

Applied Microbiology and Biotechnologie 102: 1663-1672

Elisabeth Hühner, Kristin Öqvist and Shu-Ming Li (2019)

Design of α -keto carboxylic acid dimers by domain recombination of nonribosomal peptide synthetase (NRPS)-like enzymes

Organic letters 21: 498-502

Wissenschaftliche Vorträge

Elisabeth Hühner, Katja Backhaus, Rixa Kraut and Shu-Ming Li

Heterologous expression of NRPS-like genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Posterpräsentation, Internationaler VAAM Workshop 2017 “Biology of Bacteria Producing Natural Products”, 27 – 29.02.2017, Tübingen

Elisabeth Hühner, Katja Backhaus, Rixa Kraut and Shu-Ming Li

Heterologous expression of NRPS-like genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Posterpräsentation, Spotlight Microbiology 2017, 23.11.2017, Marburg

Abkürzungen

A	Adenylierung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ANL	Acyl-CoA-Synthetasen, NRPS-Adenylierungsdomänen und Luciferase—Enzyme
AMP	Adeninmonophosphat
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AQ	Asterrichinone
AS	Aminosäure
ATP	Adenintriphosphat
Bidest.	Bidestiliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferasen
CD	Zirkularer Dichroismus (<i>Circular Dichroism</i>)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
<i>C. globosum</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
CoA	Coenzym A
d	duplett
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dd	Duplett vom Duplett
DDAQ D	Didemethylasterrichinone D
dem.	Demineralisiert
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylallyl-S-thioldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	Und andere (<i>et alii</i>)
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure (<i>genomic deoxyribo-nucleic acid</i>)
GMM	Glucoseminimalmedium
gpdA	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
J	Kopplungskonstante
Kb	Kilobasen
LB	Lysogeny Broth

m	Multipllett
M	Molarität (mol/l)
Mb	Megabasenpaare
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute
MLP	mbtH-like protein
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NCBI	<i>National center for Biotechnology Information</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrotriessigsäure
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthase
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (ARS Culture Collection)
OD	Optische Dichte
ORF	offense Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Diphosphatanion
PT/PTase	Prenyltransferase
PPTase	Phosphopantethenyltransferase
<i>Ppant</i>	Phosphopantethenyl-Gruppe
R	Reduktase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minut</i>)
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
t	Triplett
T	Thiolierung
TE	Thioesterase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
VAAM	Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie
Vol.	Volumen
w	Masse (<i>weight</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Mikroorganismen haben im Laufe ihrer Evolution zur Anpassung an ihren Lebensraum eine Vielfalt an strukturell diversen und zum Teil sehr komplexen Metaboliten entwickelt. Diese verschaffen ihnen Vorteile gegenüber anderen Bewohnern ihrer Umwelt. Die Nutzung dieser Substanzen führte zur Entwicklung von Antibiotika, Immunsuppressiva und Zytostatika. Hierbei zeigen sich besonders die Enzymklassen der Polyketidsynthasen (PKS), nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), NRPS/PKS-Hybride und NRPS-ähnliche Enzyme für die Synthese der Grundgerüste der Sekundärmetabolite verantwortlich. Die so entstandenen Substanzen können durch andere Enzyme (*tailoring enzymes*) wie beispielsweise Methyltransferasen oder Prenyltransferasen weiter modifiziert werden, wodurch oftmals die biologische Aktivität gesteigert wird. Zur fermentativen, semisynthetischen oder chemoenzymatischen Herstellung dieser Naturstoffe und deren Derivate ist ein detailliertes Wissen der Biosynthese der beteiligten Enzyme Voraussetzung. Obwohl die individuellen Domänen von NRPS und PKS inzwischen biochemisch und strukturell sehr gut untersucht sind, ist das Verständnis für die Interaktion der Domäne und die ablaufenden Mechanismen noch sehr gering. Da sich einfache Systeme wie die NRPS-ähnlichen Enzyme leichter untersuchen lassen, sollten in der vorliegenden Arbeit alle NRPS-ähnlichen Enzyme mit einer A-T-TE Enzymstruktur aus *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) und ein weiteres aus *Chaetomium globosum* (*C. globosum*) charakterisiert werden.

Zunächst sollten die NRPS-ähnlichen Gene *apvA*, *mela*, *atrA_{Ab}*, *pgnA* aus *A. terreus* mit der eigenen Promoter- und Terminatorsequenz heterolog in *Aspergillus nidulans* exprimiert werden. Obwohl eine Integration für *mela* und *atrA_{At}* ins Genom beobachtet wurde, konnte in den Ethylacetatextrakten der Kulturüberstände kein Produkt nachgewiesen werden.

Für die Expression der NRPS-ähnlichen Gene in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) sollten die Gene von cDNA bzw. gDNA amplifiziert werden. Hierdurch konnte die Exon-Intron Struktur für *apvA*, *mela*, *btyA* und *atrA_{At}* korrigiert werden. Des Weiteren konnte die Domänen Architektur für das putative NRPS-ähnlich Gen *atrA_{Ab}*, das laut der NCBI-Datenbank nur aus einer A- und einer T-Domänen bestand, durch die Amplifikation von cDNA zu einer A-T-TE-Struktur korrigiert werden. Die NRPS-ähnlichen Gene haben etwa eine Größe von 2763-2874 bp und kodieren entsprechend für 920-958 AS lange Proteine. Eine Expression der sieben NRPS-ähnlichen Gene in *S. cerevisiae* führte zu den fünf Produkten Aspuvinon E, Butyrolacton IIa, Atromentin, Phenguignarsäure und Didemethylasterrichinon D. Die Produkte wurden extrahiert und die Strukturen mittels

Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Auf einem Liter Kultur konnten für Aspulvinon E und Phenguignarsäure eine Produktion von 13 bzw. 15 mg und für Butyrolacton IIa sogar bis zu 35 mg berechnet werden.

In anschließenden Versuchen zur Isolierung der NRPS-ähnlichen Proteine stellte sich heraus, dass Affinitäts-Tags am C-Terminus die Enzymaktivität stark hemmt. Ein N-terminaler His₆-Tag hatte hingegen keinen negativen Einfluss auf die Aktivität. Anhand des Proteinnachweises mit Hilfe eines Western Blotes wurde der optimale Zeitpunkt für die Isolierung auf etwa 16 Stunden nach der Induktion der Proteinexpression durch Galaktose festgestellt. Die rekombinanten Proteine konnten mit einer Konzentration von etwa 1 ml/l Kultur aufgereinigt werden. Allerdings konnte keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Für ein alternatives Expressionssystem in *Escherichia coli* wurden die NRPS-ähnlichen Gene sowie das Phosphantethenyltransferase Gen *npgA* in die Vektoren pQE60 und pET28a(+) kloniert. Die Expression konnte aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Die A-T-TE Domänen der NRPS-ähnlichen Enzyme bilden theoretisch autonome Einheiten, die zwischen den Enzymen ausgetauscht werden können. Um diese Theorie zu überprüfen und um zusätzlich für die NRPS-ähnlichen unnatürliche Produkte zu generieren, sollten die das Substrat aktivierenden A-Domänen mit den TE-Domänen, die für Dimerisierung verantwortlich sind, kombiniert werden. Dafür wurden die A-Domänen von P_{gna}, A_{pva}, A_{sta} und A_{tqa}, die Phenyl-, 4-Hydroxy- bzw. Indolpyruvat aktivieren, mit der TE-Domäne von A_{pva}, B_{tya}, P_{gna}, A_{trA_{At}} bzw. A_{sta} rekombiniert. Die T-Domäne wurde jeweils von einem der ursprünglichen Enzyme übernommen. Insgesamt wurden 34 Konstrukte hergestellt, die zur Expression in *S. cerevisiae* verwendet wurden. Für 22 konnten die erwarteten Produkte nachgewiesen und anhand der [M+H]⁺-Ionen und deren Fragmentierungen sowie NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. So konnten Indolbutyrolacton und Indolguignarsäure synthetisiert werden, welche zuvor noch nie in der Literatur beschrieben worden waren.

Weiterhin ist bekannt, dass die durch die NRPS-ähnlichen Enzyme hergestellten Produkte oft nur das Grundgerüst für Sekundärmetabolite bilden. Daher wurde die nähere genetische Umgebung der NRPS-ähnlichen Gene untersucht. Es wurden 4 Prenyltransferasegene identifiziert, die zur Ko-Expression mit den NRPS-ähnlichen ausgewählt wurden. Leider konnte das prenylierte Produkt in den Transformaten der Bäckerhefe nicht detektiert werden.

Summary

In the course of their evolution, microorganisms have developed a variety of structurally diverse and sometimes very complex metabolites to adapt to their habitat. These give them advantages over other inhabitants of their environment. The use of these substances led to the development of antibiotics, immunosuppressants and antitumor agents. The backbone structures of these substances are often synthesized by the enzyme classes of polyketide synthases (PKSs), nonribosomal peptide synthetases (NRPSs), NRPS / PKS hybrids and NRPS-like enzymes. The resulting structures can be further modified by other tailoring enzymes such as methyltransferases or prenyltransferases, which often increases the biological activity. A detailed knowledge of the biosynthesis and of the involved enzymes is a prerequisite for the fermentative, semisynthetic or chemoenzymatic production of these natural substances and their derivatives. Although the individual domains of NRPS and PKS have biochemically and structurally been investigated, understanding of the interaction of the domain and the mechanisms involved is still very poor. Since simple systems like the NRPS-like enzymes can be investigated more easily, the NRPS-like enzymes with an A-T-TE architecture from *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) and another from *Chaetomium globosum* (*C. globosum*) will be characterized in the present work.

First, the NRPS-like genes *apvA*, *mela*, *atrA_{At}*, *pgnA* from *A. terreus* with their own promoter- and terminator-sequence should be analysed by heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. Although an integration for *mela* and *atrA_{At}* into the genome was observed, no product could be detected in the ethyl acetate extracts of the culture.

For the expression of the NRPS-like genes in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), cDNA or gDNA was used for the amplification of the genes. This made it possible to revise the exon-intron structures for *apvA*, *mela*, *btyA* and *atrA_{At}*. Furthermore, the domain architecture of the putative NRPS-like gene *atrA_{At}*, which according to the NCBI database only consisted of one A and one T domains, could be corrected by amplifying cDNA to an A-T-TE structure. The NRPS-like genes have a size of 2763-2874 bp and accordingly code for proteins of 920-958 aa. Expression of the seven NRPS-like genes in *S. cerevisiae* led to the five products aspavinone E, butyrolactone IIa, atromentine, phenguignardic acid and didemethylasterichinone D. The products were extracted and the structures were determined by means of mass spectrometry and NMR spectroscopy. For aspavinone E and phenguignardic acid, a production of 13 and 15 mg/l and for butyrolactone IIa even up to 35 mg/l could be calculated on one liter of culture.

In subsequent attempts to isolate the NRPS-like proteins, it turned out that affinity tags at the C-terminus strongly inhibit enzyme activity. In contrast, an N-terminal His₆ tag had no negative influence on the activity. On the basis of the protein detection by Western blot, the optimal point in time for isolation was determined to be around 16 hours after the induction of protein expression by galactose. The recombinant proteins could be purified with a concentration of about 1 ml/l culture. However, no catalytic activity could be detected. To test an alternative expression system, the NRPS-like genes and the phosphopantethenyltransferase gene *npgA* were cloned into the vectors pQE60 and pET28a (+) for the expression in *Escherichia*. Due to time limits the gene expression and protein isolation could no longer be carried out.

The A-T-TE domains of the NRPS-like enzymes theoretically form autonomous units that can be exchanged between the enzymes. In order to test this theory and in addition to generate unnatural products, the substrate-activating A domains were combined with the TE domains, which are responsible for the dimerisation. For this purpose, the A domains of PgnA, ApvA, AstA and AtqA for activation of phenyl-, 4-hydroxy or indole pyruvate, were recombined with the TE domain of AvpA, BtyA, PgnA, AtrA_{At} and AstA, respectively. The T domain was taken over from one of the original enzymes. A total of 34 constructs were prepared in this way which were used for expression in *S. cerevisiae*. 22 of the expected products could be detected. The structure was elucidated on the basis of the molecular ions and their fragmentation as well as NMR spectroscopy. In this way, indole butyrolactone and indole guignaric acid could be obtained, which had never before been described in the literature.

It is also known that the products of the NRPS-like enzymes often only form the basic structure for secondary metabolites. Therefore, the genetic environment of the NRPS-like genes was investigated. 4 prenyltransferase genes were identified which were selected for co-expression with the NRPS-like ones in *S. cerevisiae*. Unfortunately, the prenylated product could not be detected in the baker's yeast transformants.

1. Einleitung

1.1. Naturstoffe und Ascomycota

Seit Jahrtausenden verwenden die Menschen Stoffe aus der Natur als Heilmittel, Gifte, Duftstoffe oder Färbemittel. Noch heute ist der Haupteinsatzort der Schimmelpilze in der Industrie die Fermentation von Lebensmitteln. Beispielsweise werden *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus soja* schon seit über 1500 Jahren bei der Herstellung von Sojasauce oder Sake und *Saccharomyces cerevisiae* zur Produktion von Brot, Bier und Wein (Kück et al. 2009) verwendet. Ab 1928 rückten, durch die Entdeckung des β -Lactam Antibiotikums Penicillin, besonders die aus Mikroorganismen extrahierten Naturstoffen in den Fokus der Forschung. In den letzten Jahren ist durch die Entwicklung von modernen und kosteneffizienten Sequenzierungstechnologien sowie bioinformatische Programmen zur Analyse der Genome die Möglichkeit der Identifikation von Naturstoffe besonders in den filamentösen Pilzen rapide gestiegen (Clevenger et al. 2017; Keller 2019; Ren et al. 2017).

Im Reich der Pilze stellen die Ascomyceten (Schlauchpilze) mit rund 64.000 bekannten Arten die größte Abteilung dar (Moore et al. 2011). Hochrechnungen lassen jedoch vermuten, dass es etwa 2,5 Millionen Arten im Pilzreich und somit etwa 300.000 Ascomyceten gibt (Hawksworth and Lucking 2017). Diese wachsen entweder als einzellige Hefen oder bilden ein Mycel aus. Die meisten Ascomyceten ernähren sich saprotroph aber es sind auch biotrophe und nekrotrophe Parasiten (z.B. echter Mehltau) bekannt. Einige wenige Arten leben aber auch in Symbiose mit Algen oder Pflanzen und bilden auf diese Weise Flechten bzw. Mykorrhiza (z.B. echte Trüffel).

Ihren Namen tragen die Ascomyceten, da die sexuelle Sporen in den schlauchähnlichen Asci produziert werden (teleomorphe Fortpflanzung) (Bennett and Turgeon 2016). Die asexuelle (anamorphe) Fortpflanzung erfolgt über die durch mitotische Teilung entstehenden Konidiosporen (Kück et al. 2009). Die Morphologie der teleomorphen und anamorphen Stadien unterscheidet sich teilweise sehr stark voneinander. Erst durch moderne molekulargenetische Analysen konnten diese früher als Fungi imperfecti oder Deuteromycetes bezeichneten Stadien zweifelsfrei einer Art zugeordnet werden. Ascomycota werden in drei Unterabteilungen gegliedert: Taphrinomycotina, die Saacharomycotina (mit den Echten Hefen) und die Pezizomycotina (Echte Schlauchpilze). Den Pezizomycotina werden auch die Gattungen *Aspergillus* und *Chaetomium* zugeordnet, welche einen wesentlichen Bestandteil dieser Arbeit bilden und in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

1.1.1. Die Gattungen *Aspergillus* und *Chaetomium*

Die Gattung *Aspergillus* gehört zur Familie der Aspergillaceae innerhalb der Ordnung der Eurotiales. Derzeit werden der Gattung etwa 450 Arten zugeordnet, die in sechs Untergattungen (*Aspergillus*, *Circumdanti*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Cremeri* und *Polypaecilum*) und 27 Sektionen eingeteilt werden (Houbraken et al. 2020). Aufgrund der Form ihrer Konidiophoren (Konidienträger) wird die Gattung umgangssprachlich auch als Gießkannenschimmel bezeichnet. Die Konidiophoren werden aus Hyphen gebildet und stehen senkrecht vom Mycel ab (Abbildung 1-1). Sie enden in einer vesikelartigen Struktur, auf der je nach Species entweder direkt die Phialiden befestigt sind oder das Vesikel ist mit Metulae besetzt, die Bündel aus Phialiden tragen. Die Phialiden schnüren letztlich Ketten von Konidien ab, die nach völliger Reife freigesetzt werden (Kück et al. 2009). Wichtiger Vertreter der Gattung in der Industrie sind vor allem *Aspergillus niger* als Produzent der Zitronensäure (Amato et al. 2020) und *Aspergillus terreus*, auf den im folgenden Kapitel (1.1.1.1) näher eingegangen wird. In der Medizin ist *Aspergillus fumigatus* als häufigster opportunistischer Erreger der invasiven Aspergillose zu nennen (Vahedi and Lass-Florl 2019).

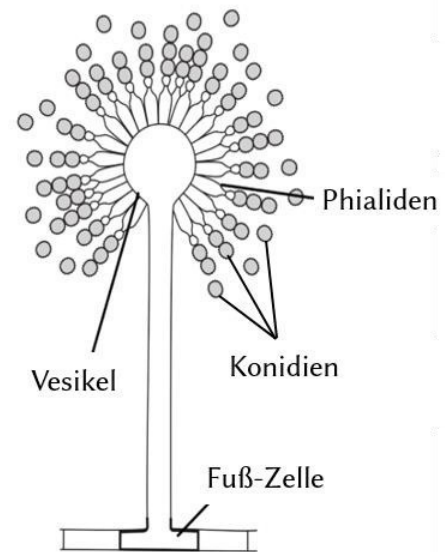


Abbildung 1-1: Darstellung eines Konidiophors der Gattung *Aspergillus*. Modifiziert (Bildquelle: commons.wikimedia.org/wiki/File:Conidiophores,_Aspergillus,_Penicillium,_Eurotiales,_Ascomycota.png)

Die Gattung *Chaetomium* gehört zur Familie der Chaetomiaceae innerhalb der Ordnung der Soridariales. Inzwischen sind etwa 150 verschiedene *Chaetomium*-Arten bekannt, die sich in sechs phylogenetische Gruppen unterteilen lassen (Zhang et al. 2017). Etwa ein Drittel der Arten gehört zu der Gruppe *Chaetomium globosum* (*C. globosum*) (Wang et al. 2016a). Ein Merkmal der Gattung *Chaetomium* ist die Bildung von Fruchtkörpern in Form von rundlichen Peritheciis (Abbildung 1-2) (Abdel-Azeem 2020). Die oftmals zitronen-förmigen Ascosporen reifen in keulenförmigen Asci und werden nach der Reifung über eine Pore an der Oberseite des Peritheciis, der sogenannten Ostiole freigesetzt. Die

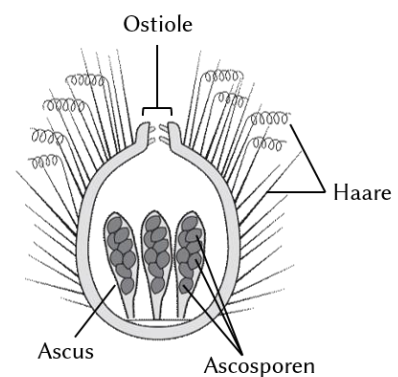


Abbildung 1-2: Darstellung eines Peritheciis der Gattung *Chaetomium*. Modifiziert (Bildquelle: traillab.natsci.msu.edu/research-projects/evolution-of-perthecim-development)

Ostiole ist meist von zahlreichen, geraden oder spiralförmigen, dunklen Haare (Setae) umgeben.

Vertreter dieser Gattung sind weltweit in diversen Ökosystem, häufig auf verrottenden organischen Materialien zu finden (Abdel-Azeem 2020). Ihre zellolytischen Eigenschaften werden in der Industrie für Tests zur Widerstandsfähigkeit von Materialien gegenüber Schimmelpilzen genutzt (Zhang et al. 2006).

1.1.1.1. *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus (*A. terreus*) ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz mit saprotropher Ernährung (Zersetzung toten organischen Materials). Die erste wissenschaftliche Erwähnung war 1918, aber erst 2013 wurde die sexuelle Vermehrungsweise nachgewiesen (Arabatzis and Velegraki 2013). Beim Wachstum einer Kolonie bildet sich auf der Oberseite zunächst ein weißes, teilweise flauschiges Mycel, die Unterseite weist eine gelb bis dunkelbraun Färbung auf. Durch die Bildung der Konidiosporen nehmen die *A. terreus* Kolonien eine ockergelbe bis zimtbraune Farbe an, anhand derer sie sich von anderen *Aspergillus* Arten unterscheiden lassen (Abbildung 1-3 A und B) (Geib et al. 2016). Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal ist die Ausbildung von Aleurosporen (auch „*assecory conidia*“) (Balajee 2009). Diese dickwandigen hyalinen Zellen, die in Submerskulturen seitlich direkt an den Hyphen gebildet werden, liegen meist einzeln vor und sind deutlich größer als normal gebildete Konidien (Abbildung 1-3 C) (Balajee 2009).

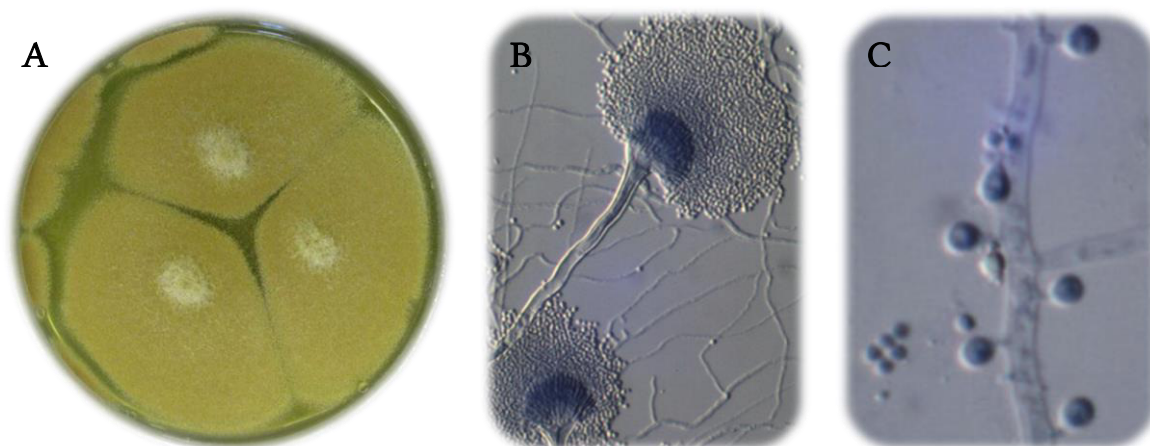


Abbildung 1-3: Kultur (A) und mikroskopische Bilder von dem Perithecium (B) und den Aleurosporen (C) von *A. terreus*. Aus A) <http://fungi.myspecies.info/file/954> B + C) <http://www.aspergillus.org.uk/images-library>

2006 wurde das 29,33 Mb große Genome durch das Broad Institute (Cambridge, MA, USA) sequenziert. Die etwa 10.500 proteinkodierenden Gene sind auf acht Chromosomen

verteilt. Bisher wurden 74 Gene identifiziert, die für die Biosynthese der Kernstrukturen von Sekundärmetaboliten verantwortlich sind. Darunter fallen auch die Gene von 28 Polyketidesynthetasen (PKSs), 22 Nicht-Ribosomalen Peptid Synthasen (NRPSs) ein Hybrid aus NRPS und PKS und 16 NRPS-ähnliche Enzyme (Guo and Wang 2014; Khaldi et al. 2010).

Nur etwa 4% der durch *Aspergillus* Arten hervorgerufenen invasiven Erkrankungen (Aspergillosen) sind auf *A. terreus* zurückzuführen (Vahedi and Lass-Florl 2019). Seine intrinsische Resistenz gegen Amphotericin B, welches als Standard-Therapeutikum bei Aspergillosen eingesetzt wird, erschwert jedoch die Behandlung (Lass-Florl 2018; Posch et al. 2018).

In der pharmazeutischen Industrie weckte *A. terreus* als Produzent von Statinen großes Interesse und noch heute wird das Cholesterol senkende Lovastatin in großen Mengen durch Fermentation in dem Pilz hergestellt (Abbildung 1-4) (Subhan et al. 2016). In der Kunststoffindustrie dient der Pilz der Herstellung großer Mengen Itaconsäure, einem Grundbaustein für die Herstellung von Kunstharzen und synthetischen Fasern (Abbildung 1-4) (Saha 2017). Des Weiteren finden sich einige biologisch aktive Stoffe wie Patulin (Puel et al. 2010), Citreoviridin (Lin et al. 2016), Geodin (Nielsen et al. 2013), Terretonin (Balibar et al. 2007), sowie Butyrolactone und Aspulvinone (Guo et al. 2013a) unter den Sekundärmetaboliten von *A. terreus*.

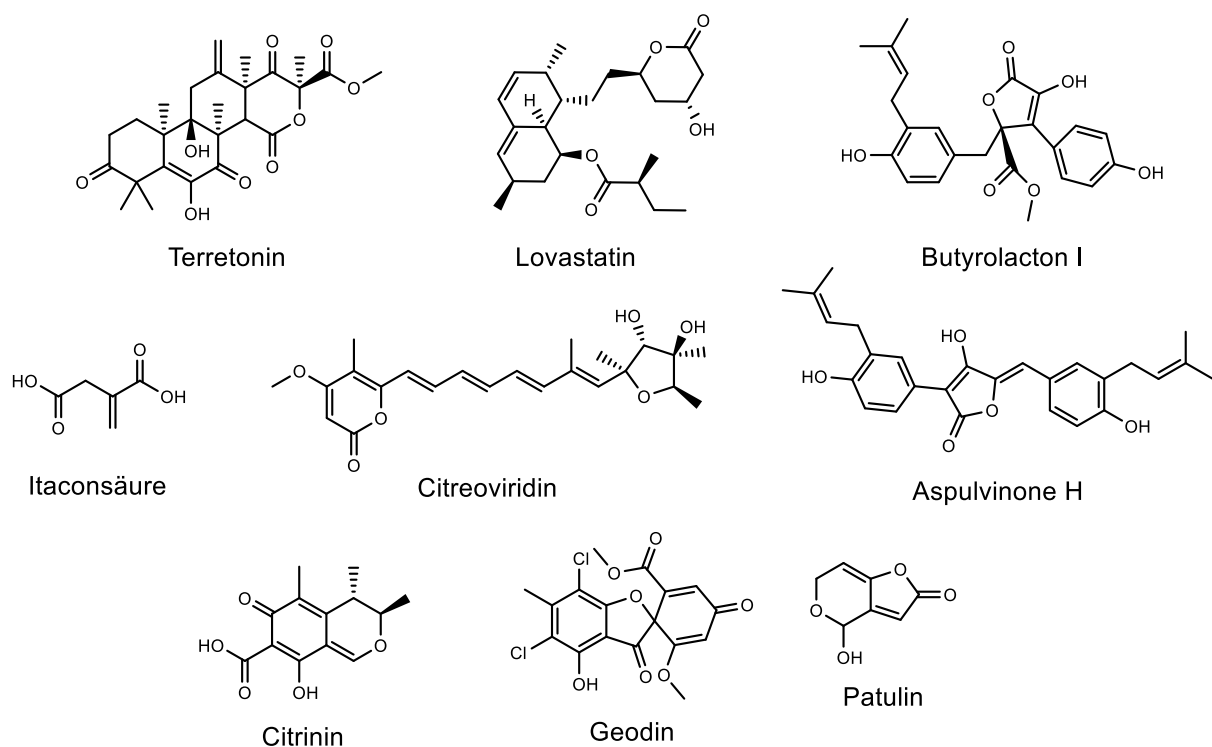


Abbildung 1-4: Strukturen einiger ausgewählter Sekundärmetabolite aus *A. terreus*

1.1.1.2. *Chaetomium globosum*

Die erste Erwähnung von *Chaetomium globosum* (*C. globosum*) in der Literatur erfolgte im Jahr 1817 durch Gustav Kunze. Seine Kolonien sind anfangs weiß und färben sich später durch die Bildung der dunklen, mit zahlreichen verzweigten Haaren besetzten Perithecieen braun bis graubraun (Abbildung 1-5). Das optimale Wachstum zeigt der Pilz bei einer Temperatur zwischen 25-27 °C und einem neutralen pH-Wert, dabei hängt die Entwicklung und Morphologie der Kolonien stark von dem verwendeten Medium ab (Prokhorov and Linnik 2011). In einem eher sauren Milieu wird die Entwicklung der Perithecieen und der in ihnen enthaltenen braunen, zitronenförmigen Ascosporen gefördert (Abbildung 1-5) (Fogle et al. 2008).

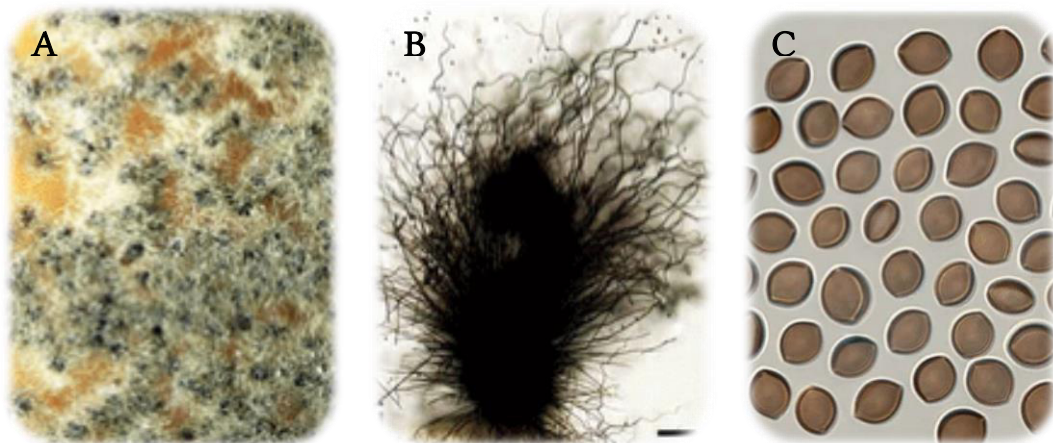


Abbildung 1-5: Kultur (A) und mikroskopische Bilder von dem Perithecium (B) bzw. den Ascosporen (C) von *C. globosum*. Modifiziert nach Wang et al. 2016

Das im Jahr 2004 durch das *Broad Institute* sequenzierte Genom wurde in 2005 annotiert. Es besteht aus 34,89 Mb und enthält 11.124 proteinkodierende Gene.

In Gebäuden ist *C. globosum* ein typischer Besiedeler von feuchten Räumen und wird oft nach Wasserschäden gefunden (Miller and McMullin 2014). Die Abgabe von flüchtigen organischen Verbindungen und Mykotoxinen sowie die Freisetzung von Sporen von dem Pilz können Allergien ausgelöst oder zur Entwicklung von Asthma beitragen. Darüber hinaus ist *C. globosum* als Erreger von oberflächlichen Infektionen wie beispielsweise der Onychomykose bekannt (Shi et al. 2016). Aufmerksamkeit erregte der Pilz auch durch seine antagonistischen Aktivitäten gegenüber diversen Mikroorganismen und sein Potential wirtschaftlich wichtige Pflanzenkrankheiten zu bekämpfen (Gond et al. 2012).

C. globosum produziert eine Reihe von Sekundärmetaboliten, wie beispielsweise das zu den Asterriquinonen gehörende Cochliodinol, die zytotoxischen Chaetoglobosine, die antimikrobiell wirksamen Diketopiperazine und Chaetoviridine sowie diverse Indolalkaloide (Abbildung 1-6) (Abdel-Azeem 2020; Park et al. 2005; Xu et al. 2014; Zhang et al. 2012). Bei

der Behandlung von Krebs weist das Chaetomin vielversprechende Ergebnisse bei der Bekämpfung von Tumoren auf (Dewangan et al. 2018; Viziteu et al. 2016; Yano et al. 2011).

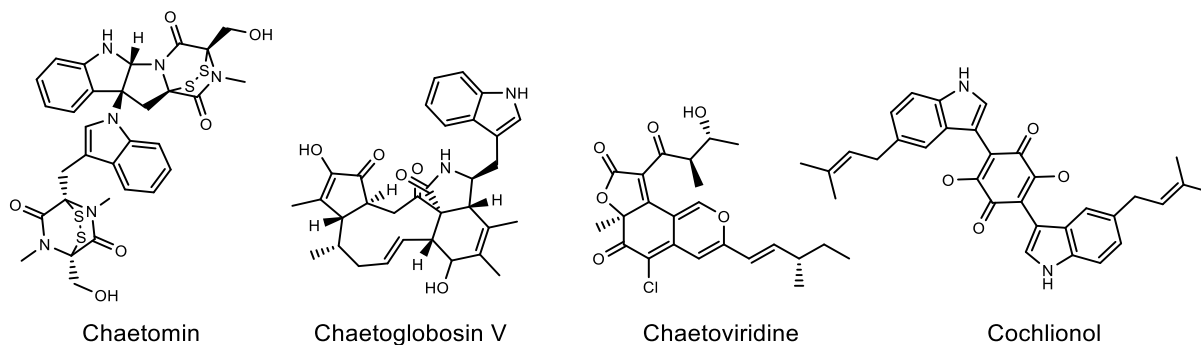


Abbildung 1-6: Strukturen einiger ausgewählter Sekundär Metabolite aus *C. globosum*

1.2. Nicht-ribosomale Peptidsynthasen

1.2.1. Allgemein

Eine Fülle der in Pilzen und Bakterien zu findenden Sekundärmetabolite wird von modular aufgebauten Enzymen generiert. Zu den wichtigsten Klassen gehören die Polyketidsynthasen (PKS), Nicht-ribosomalen Peptid Synthetasen (NRPS), PKS-NRPS Enzym-Hybride sowie den PKS- und den NRPS-ähnlichen Enzymen (*PKS-like/NRPS-like*). Diese Enzyme sind modulare, zum Teil hochkomplexe Enzyme. NRPS sind in der Lage Peptidverbindungen ohne Beteiligung der Ribosomen aufzubauen, wobei neben den 20 proteinogenen Aminosäuren auch unnatürliche Aminosäuren, α -Hydroxysäuren, α -Ketosäuren oder Fettsäuren in das entstehende Peptid integriert werden können. Für über 500 verschiedene Moleküle konnte inzwischen eine Integration in ein Nichtribosomales Peptid (NRP) dokumentiert werden (Kudo et al. 2019; Walsh et al. 2013). Die zahlreichen Arten an Grundbausteinen gekoppelt mit internen Modifikations-Domänen und nachfolgenden Enzymen ermöglicht die Biosynthese einer bemerkenswerten Vielfalt von komplexen Strukturen mit diversen biochemischen Eigenschaften (Abbildung 1-7).

NRPS sind hauptsächlich in Pilzen und Bakterien zu finden. Dokumentierte Ausnahmen hiervon bilden die NRPS Ebony aus der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (Izore et al. 2019; Richardt et al. 2003) und das für die Synthese von Nemamid A und Nemamid B verantwortliche PKS-NRPS-Hybrid aus dem Wurm *Caenorhabditis elegans* (Shou et al. 2016). In den Mikroorganismen sind die Produkte der NRPS in den meisten Fällen an der Bildung von Sekundärmetaboliten beteiligt. Lebenswichtig sind jedoch vor allem die durch NRPS

produzierten Siderophore, die zur Versorgung der Mikroorganismen mit Eisen beitragen, das einen wichtigen Cofaktor für die Enzyme der Atmungskette darstellt. Einige wichtige Beispiele für Siderophore sind die Bactine, zu denen Enterobactin (Drake et al. 2006; Gehring et al. 1998) und das Vibriobactin gehören (Keating et al. 2000). Aber auch viele andere der durch NRPS produzierte Sekundärmetabolite sind für den Menschen bedeutsam, da sie bemerkenswerte pharmakologische und biomedizinische Eigenschaften haben. So lassen sich beispielsweise die heutzutage selbstverständlich genutzten β -Lactam-Antibiotika (Friedrich 2006), das immunsuppressiv wirksame Cyclosporine A (Survase et al. 2011) und das zytostatische Bleomycin A2 (Rahaman 2018) auf eine NRPS zurückführen.

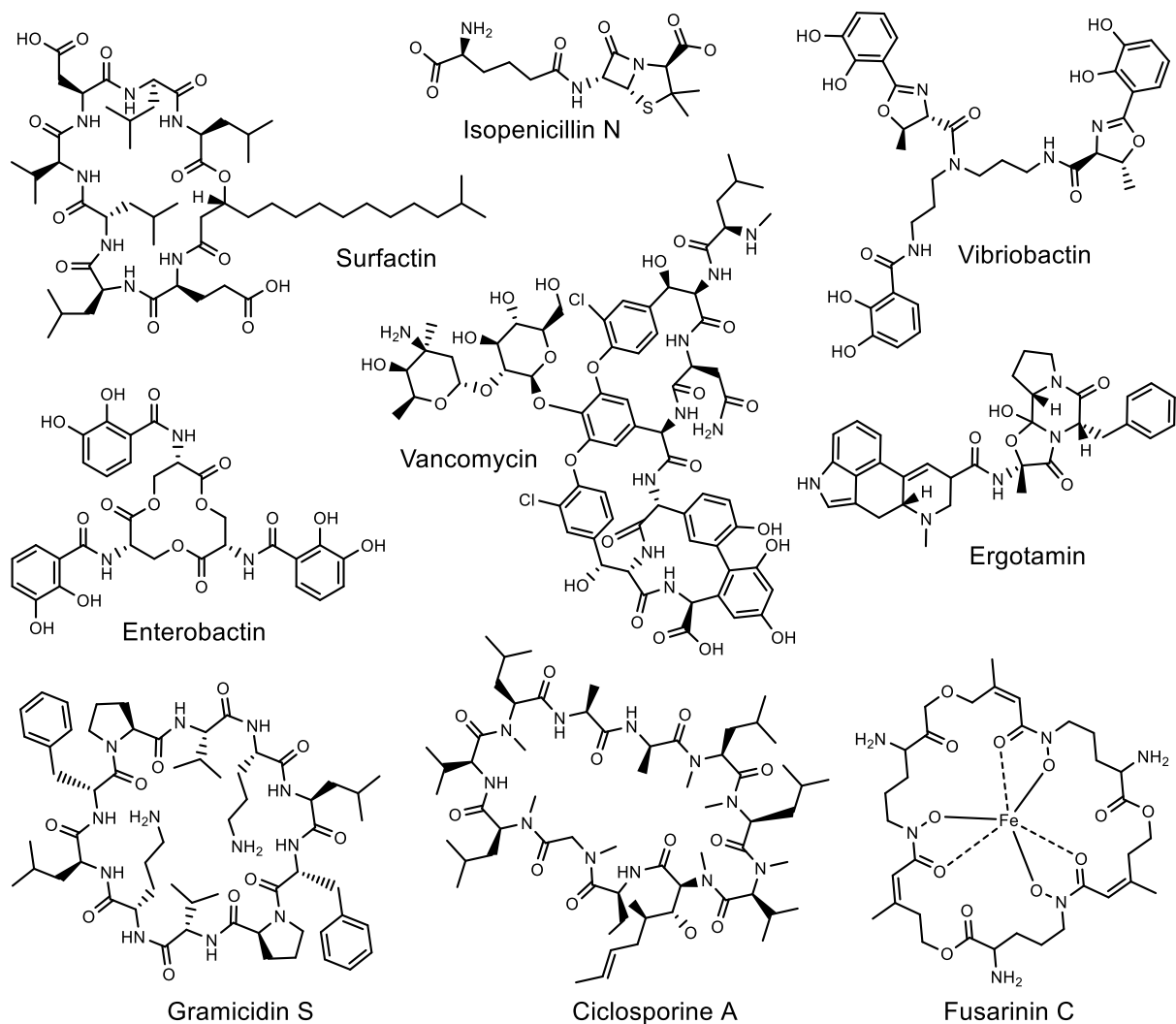


Abbildung 1-7: Beispiele mikrobieller Sekundärmetabolite, an deren Biosynthese NRPS beteiligt sind.

Hinsichtlich der Abfolge der Prozessierungsreaktionen der NRPSs werden drei Grundtypen unterschieden. Die am besten dokumentierten NRPS sind lineare NRPS (Typ A). Bei der Biosynthese eines NRP durch den Typ A wird vom N-Terminus ausgehend pro Modul

ein Monomer in das wachsende Peptid eingebaut. Die Anzahl und Anordnung der Module bestimmen somit direkt die Größe und Struktur des am C-Terminus freigesetzten Produktes. Surfactin und Vancomycin werden auf diese Weise synthetisiert (Cosmina et al. 1993; Lee et al. 2016). Iterative NRPS (Typ B) nutzen während der Synthese des Produktes ihre Module mehrfach. Die entstehenden Peptide besitzen sich wiederholenden Untereinheiten, wie beispielsweise das Siderophor Enterobactin oder das antibiotisch wirkende Gramacidin S (Hoyer et al. 2007; Shaw-Reid et al. 1999). In Nicht-linearen NRPS (Typ C) werden einzelne Module mehr als einmal verwendet. Folglich lassen sich durch die Anzahl und die Anordnung der Module keine Rückschlüsse auf das entstehende Produkt ableiten, wie es bei der Synthese von Vibriobactin geschieht (Keating et al. 2000).

Unabhängig von der Art der Synthese besteht ein Basis-Modul einer NRPS, welches die minimale Anzahl an Domänen zur Integration eines Monomerbausteins in die Peptidkette enthält, aus einer Adenylierungs(A)-Domäne, einer Thiolierungs(T)-Domäne und einer Kondensierungs(C)-Domäne (*engl. = condensation*) (Abbildung 1-8). Jede Domäne übernimmt eine spezifische Aufgabe bei der Synthese des Peptides und ist somit essentiell für die Funktionalität des Enzymes. Die A-Domänen erkennen selektiv ein Monomer, aktivieren dieses und übertragen es auf die T-Domäne. Die Verknüpfung zweier dieser kovalent an die T-Domänen gebundene Substrate wird schließlich von der C-Domäne katalysiert. Aufgrund der Fließband-ähnlichen Abfolge der Reaktionen wird oft auch von einer „assembly line“ gesprochen.

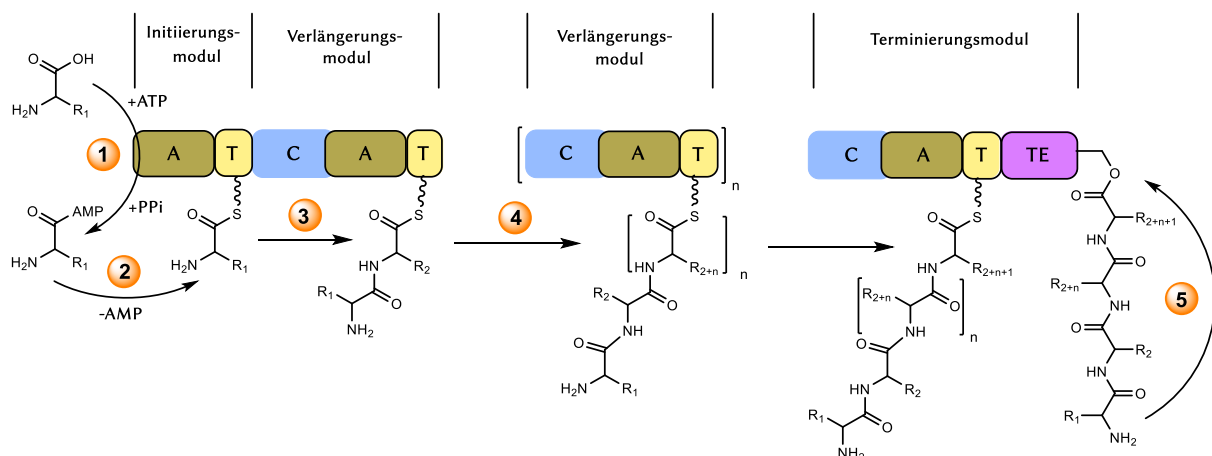


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der nichtribosomalen Peptidsynthese.
 Zunächst aktiviert die A-Domäne unter ATP-Verbrauch ein Monomer (1) und überträgt es an die T-Domäne (2). Die C-Domäne katalysiert die Verknüpfung zwischen zwei gebundenen Molekülen (3). Der Prozess wird so lange wiederholt, bis die Kettenlänge erreicht ist (4). Zur Produktfreisetzung wird die Oligopeptidkette auf die TE-Domäne übertragen und von dieser abgespalten (5).

In vielen Fällen weisen NRPSs neben den drei primären Domänen N-terminal eine Thioesterase(TE)-Domäne auf. Diese ist für die Freisetzung des Produktes verantwortlich und katalysiert oftmals gleichzeitig dessen Makrocyclisierung (Kapitel 1.2.5.1). Zudem gibt es noch eine Reihe von Modifikations-Domänen, die verschiedene Reaktionen katalysieren können (Kapitel 1.2.5). Im Folgenden wird der Kenntnisstand über die für diese Arbeit wichtigsten Domänen eingegangen.

1.2.2. Adenylierungsdomäne

In NRPS Enzymen wird die Selektion und Aktivierung der Substrate durch die Adenylierungs(A)-Domänen katalysiert, welche zur ANL Superfamilie (Acyl-CoA-Synthetasen, NRPS-Adenylierungsdomänen und Luciferase-Enzyme) gehören (Gulick 2009; Schmelz and Naismith 2009). Die Enzyme dieser Familie katalysieren in einem ersten Mg^{2+} - und ATP-abhängig Schritt die Adenylierung einer Carbonsäure (Abbildung 1-9). Im Anschluss wird in einem zweiten Schritt das Aminoacyl-AMP-Intermediat auf den 4'-Phosphopantethenyl-Arm (4'-Ppant-Arm) der *downstream* gelegenen T-Domäne übertragen. Hierbei ist die A-Domäne auch für die Abschirmung des für Hydrolyse anfälligen Intermediates verantwortlich.

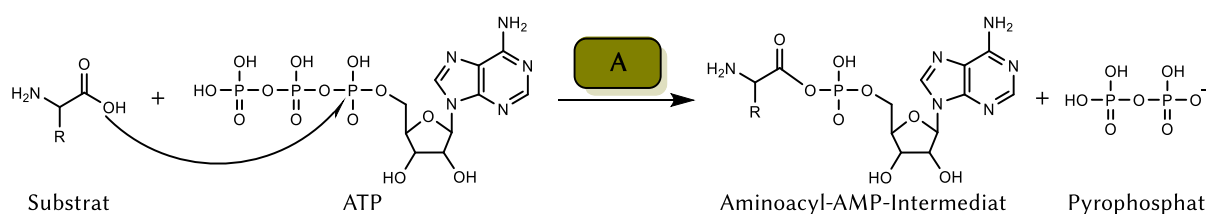


Abbildung 1-9: Durch die A-Domäne katalysierte Adenylierungsreaktion

Strukturanalysen von A-Domänen haben zwei Bereiche identifiziert, die für die katalytische Funktion verantwortlich sind. Das aus etwa 400-450 Aminosäuren bestehende Kernmotiv (A_{Kern}) und die C-terminal lokalisierte Untereinheit (A_{sub}), die circa 100 Aminosäuren umfasst (Abbildung 1-10). Die beiden Einheiten werden mit einer kleinen Schlaufe, der sogenannten *hinge*-Region, flexibel miteinander verbunden (Drake et al. 2016; Yonus et al. 2008). Auf diese Weise wird eine flexible Orientierung der beiden Untereinheiten zueinander ermöglicht, welche einen wesentlichen Bestandteil des katalytischen Mechanismus darstellt. Anhand verschiedener Kristallstrukturanalysen konnte ein Einblick in den katalytischen Zyklus der A-Domänen gewonnen werden (Conti et al. 1997; Drake et al. 2016; Lee et al. 2010; Reger et al. 2008; Reimer et al. 2016; Zettler and Mootz 2010).

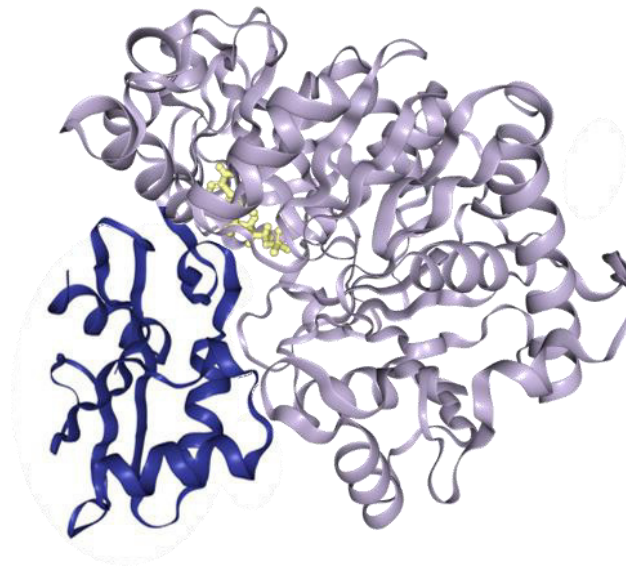


Abbildung 1-10: Struktur der A-Domäne von FscC (PDB-Code: 6E60). Die Kern-Domäne ist in violett und die Sub-Domäne in blau dargestellt. Der Ligand AMP ist in gelb gezeigt.

Ein Zyklus einer Adenylierungs-Reaktion beginnt mit einer „offenen“ Konformation. Die beiden Untereinheiten orientieren sich voneinander weg, wodurch das aktive Zentrum frei liegt. Dies ermöglicht die Bindung von ATP, Mg^{2+} als auch des Substrates. Die Bindung der Reaktionsbestandteile induziert wiederum die Rotation der A_{sub} , welche infolgedessen den Zugang zum katalytischen Zentrum verschließt. Desweiteren wird durch die Rotation das für die Adenylierung essenzielle Lysin zum aktiven Zentrum re-lokalisiert. Dieser streng konservierte Lysin-Rest stabilisiert das Substrat und ATP und verhindert dadurch insbesondere die Reaktion des hoch negativ geladenen Intermediates. Dieses Lysin bildet somit eine Schlüssel Komponente des katalytischen Zentrums (Osman et al. 2009). Nachdem die Adenylierungsreaktion abgeschlossen ist, dreht sich die A_{sub} -Einheit um etwa 140° . Dabei wird das entstandene Pyrophosphat freigesetzt und es entsteht ein Zugang zur Substratbindungstasche. Außerdem induziert die Rotation der A_{sub} die Relokalisation der T-Domäne in Richtung der A-Domäne. Die so entstandene räumliche Nähe ermöglicht die kovalente Bindung des Aminoacyl-Intermediat an den Ppant-Arm der T-Domäne für den weiteren Reaktionsablauf der NRPS *assembly line*.

Neben dem schon erwähnten für die Adenylierung essentiellen und somit streng konservierten Lysinrest, wurden in A-Domänen weitere konservierte Bereiche identifiziert. Die Aminosäurereste dieser konservierten Motive (Motif A1-A10) gewährleistet die korrekte Positionierung des Substrates im katalytischen Zentrum (Conti et al. 1997). Da sie nicht nur die verlässliche Vorhersage der durch die A-Domäne aktivierten Substrate ermöglichen (Challis et al. 2000; Kudo et al. 2019; Stachelhaus et al. 1999), sondern folglich auch Rückschlüsse auf das durch ein NRPS-System generiertes Produkt gewähren (Challis and

Ravel 2000), werden diese Kernmotive auch als „nicht-ribosomaler Code“ bezeichnet. Die Nutzung dieser Erkenntnisse führte schließlich zur Weiterentwicklung von den Bioinformatischen Programmen, die heutzutage die Suche nach NRPS-Genclustern *in silico* ermöglichen (Blin et al. 2019; Skinnider et al. 2015).

Inzwischen gibt es auch einige Beispiele für A-Domänen, die eine geringere Substratspezifität aufweisen und verschiedene Monomere als Substrat akzeptieren. So ist CahJ, die erste A-Domäne in der Synthese von Cahuitamycine, in der Lage entweder Salicylsäure oder 6-Methyl-Salicylsäure in das Peptid zu integrieren (Tripathi et al. 2018). Aber auch Substrate, die sich strukturell stärker unterscheiden, wie Arginin und Tyrosin können von einer einzelnen A-Domäne akzeptiert werden (Kaljunen et al. 2015). Neuere Studien zeigen außerdem, dass C-Domänen Einfluss auf die Auswahl des Substrates seitens der A-Domäne haben können (Meyer et al. 2016). Des Weiteren kann die strukturelle Vielfalt der in die Peptidkette integrierten Moleküle mittels A-Domänen erhöht werden, die sogenannte Hilfsdomänen enthalten und das aktivierte Substrate direkt modifizieren (Labby et al. 2015).

In Bakterien ist die Funktionalität einiger A-Domänen von den sogenannten MbtH-ähnlichen Proteinen (*mbtH-like protein* = MLP) abhängig (Felnagle et al. 2010; Herbst et al. 2013). Diese kleinen Hilfsproteine wurden aufgrund ihrer Ähnlichkeit dem *mbtH*-Gen im Biosynthesegencluster des Siderophors Mycobactin in *Mycobacterium tuberculosis* benannt (Quadri et al. 1998a). Die MLPs haben eine essentielle Bedeutung für die effiziente Funktionalität der A-Domänen, indem sie eine korrekte Faltung der Domäne fördern, sowie die Aktivität und Stabilität der Proteine steigern (Schomer and Thomas 2017; Wolpert et al. 2007). Außerdem können innerhalb eines Genoms die MLP aus verschiedenen NRPS-Genclustern gegenseitig komplementieren werden (Esquilin-Lebron et al. 2018). Vor kurzem konnte durch eine Heterologe Expression von bakteriellen MLPs in *Penicillium chrysogenum* die Produktivität der fungalen NRPS erhöhen werden (Zwahlen et al. 2019).

1.2.3. Thiolierungsdomäne und Phosphopantetenyltransferasen

In der Regel folgt im Anschluss an die A-Domäne C-terminal eine Thiolierungs(T)-Domäne (Stachelhaus et al. 1996). Diese aus ca. 80-100 Aminosäuren zusammengesetzte Domäne ist für die Translokation der Intermediate zu den katalytischen Reaktionszentren während der Peptidsynthese verantwortlich und wird daher oft auch als *Peptidyl-Carrier-Protein* (PCP)-Domäne bezeichnet. Sie weist eine große Ähnlichkeit mit den *Acyl-Carrier-Protein* (ACP)-Domänen der Fettsäure- und der Polyketidesynthasen auf und besitzen wie

diese keine eigenständige katalytische Funktion. Auch ist diesen Träger-Domänen (engl.: *carrier domain*) gemein, dass die Bindung der Intermediate über den Kofaktor 4'-Phosphopantethein (Ppant) erfolgt, welcher zuvor in einer posttranslationalen Reaktion kovalent an die Domänen gebunden wurde (Lambalot et al. 1996; Walsh et al. 1997).

Für die Aktivierung des nach der Synthese zunächst inaktiven NRPS-Enzymes (*apo* Form) in die enzymatisch aktive *holo*-Form wird ein Phosphopantetheinrest von Coenzym A (CoA) mithilfe einer 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) auf ein hochkonserviertes Serin in den T-Domänen übertragen (Beld et al. 2014; Mootz et al. 2001). In der durch die PPTase katalysierten Reaktion greift die Hydroxylgruppe des Serinrests zunächst die β -Phosphatgruppe von CoA an. Im Anschluss wird der Ppant-Arm übertragen und dabei das 3',5'-Adenosindiphosphat (3',5'-ADP) freigesetzt (

Abbildung 1-11).

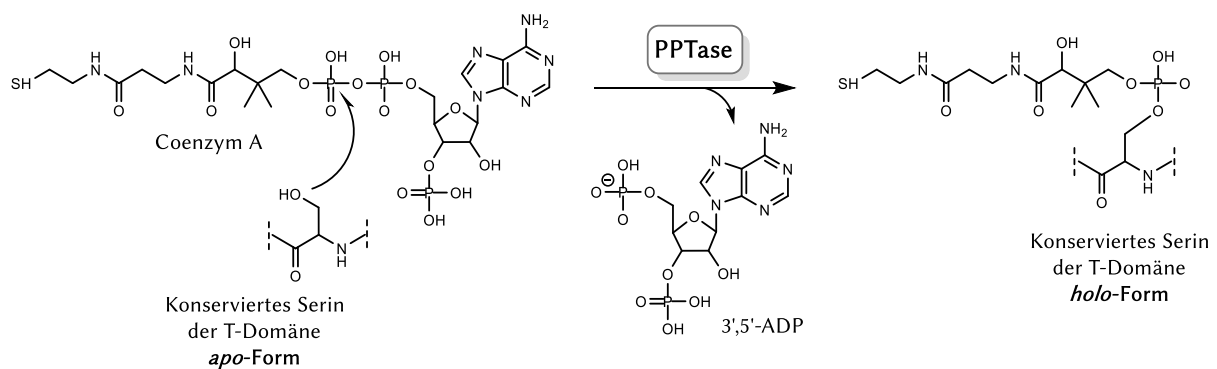


Abbildung 1-11: Phosphopantethenylierung der T-Domäne durch die PPTase. In der Mg^{2+} -abhängigen Reaktion katalysiert die PPTase den nukleophilen Angriff der Serinseitenkette auf die β -Phosphatgruppe von Coenzym A.

Die Anzahl der identifizierten PPTasen ist in den meisten Mikroorganismen deutlich geringer als die Anzahl der zu modifizierenden multimodularen Synthasen, was auf eine geringe Spezifität der PPTasen gegenüber den Träger-Domänen hindeutet. So wurde beispielsweise in *A. nidulans* für NpgA eine Beteiligung an der Bildung von Siderophoren sowie von Pigmenten nachgewiesen (Kim et al. 2015; Oberegger et al. 2003). In *Bacillus subtilis* erkennt die *Acyl carrier protein synthase* (AcpS) spezifisch die ACPs der Fettsäuresynthese des primären Metabolismus (Mootz et al. 2001) während das an der Synthese von Surfactin beteiligte Sfp eine Vielzahl an Träger-Domänen toleriert (Quadri et al. 1998b; Yang et al. 2017). Einige der PPTasen sind nicht nur in der Lage eine Vielzahl von Träger-Domänen zu modifizieren sondern auch zahlreiche CoA-Derivate zu übertragen (Wang et al. 2016b). Inzwischen werden PPTasen nicht nur bei der Analyse von Carrier Proteinen verwenden,

sondern finden auch Anwendung als molekularbiologische Werkzeug (La Clair et al. 2004; Song et al. 2018).

Die Struktur von isolierten T-Domänen lässt sich aufgrund ihrer relativ geringen Größe gut mittels NMR-Spektroskopie in Lösung untersuchen (Haslinger et al. 2015; Koglin et al. 2006; Weber et al. 2000). Die Untersuchungen zeigen, dass die T-Domänen aus vier α -Helices zusammengesetzt sind, die sich als Bündel falten (Abbildung 1-12) (Haslinger et al. 2015; Jaremko et al. 2015). Dabei verlaufen die Helix 1 und 2 meist parallel zueinander und stellt die Rückseite der Domäne dar. Sie sind in der Regel länger als die Helices 3 und 4, welche oftmals gegen die beiden ersten Helices ausgerichtet sind. Die zweite Helix trägt am N-Terminus das GxxS-Kernmotiv, an dem die posttranslationale Modifikation des Serins durch die PPTase stattfindet (Stein et al. 1996). Die zweite Helix verkörpert außerdem zusammen mit der Schleife, die die erste und zweite Helix verbindet und der dritten Helix die Hauptinteraktionsfläche mit den verschiedenen katalytischen Zentren, wie den A-, C-, TE-, E-, F-Domänen aber auch mit autonomen Modifikationsenzymen wie den PPTasen oder Cytochrom P450 Enzymen (Harden and Frueh 2017; Jaremko et al. 2015; Jaremko et al. 2017).

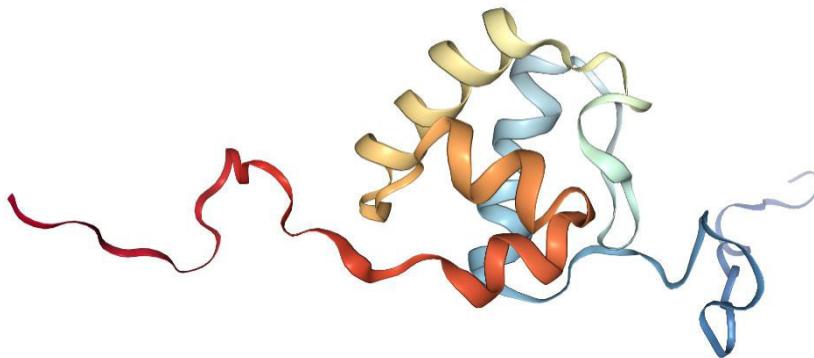


Abbildung 1-12: Struktur der ersten T-Domäne (apo-Form) von der Yersiniabactin Synthetase (PDB-Code: 5U3H).

Jedoch ist bis heute noch nicht geklärt auf welche Weise die T-Domänen die Intermediate zwischen den Reaktionszentren transportieren. Zu Beginn der strukturellen Analysen wurde postuliert, dass die Translokation auf eine von der Ladung abhängigen Konformationsänderung (A-, A/H und H-Zustand) zurückgeht. Aktuelle Studien deuten allerdings auf eine statische Struktur der T-Domänen hin (Izore and Cryle 2018).

1.2.4. Kondensierungsdomäne

Zwischen zwei Einheiten bestehend aus A- und T-Domänen befindet sich in der Regel die Kondensations(C)-Domänen (engl.=*condensation*), die die Peptidbildung von zwei

Substraten miteinander katalysiert (Stachelhaus et al. 1998). Sie bestehen aus ungefähr 450 Aminosäuren und können aufgrund ähnlicher Sequenzmotive der Superfamilie der Chloramphenicol-Acetyltransferasen (CAT) zugeordnet werden. Besondere Aufmerksamkeit erregte bei den Sequenzanalysen der C-Domänen das konservierte HHxxxDG-Motiv, welches in den CAT eine essentielle Rolle in der Vernüpfung der Substrate einnimmt, indem es den nucleophilen Angriff und somit den Transfer des Substrates fördert. Mutationsstudien des HHxxxDG-Motives der C-Domänen führten zu kontroversen Ergebnissen. So wurde durch die Mutation des zweiten Histidins in verschiedenen Untersuchungen das Enzym inaktiviert (Bergendahl et al. 2002; Gaudelli et al. 2015; Stachelhaus et al. 1998), in anderen Studien hingegen behielt das Enzym nach Mutationen in dem Motiv im Wesentlichen seine Aktivität (Keating et al. 2002; Marshall et al. 2002; Roche and Walsh 2003; Samel et al. 2007). Inzwischen wird vermutet, dass das HHxxxDG-Motiv eine entscheidende Rolle bei der korrekten Positionierung der α -Amingruppe bei der Verknüpfung durch die C-Domäne spielt (Bloudoff et al. 2016).

Anhand der Kristallstrukturen von alleinstehenden C-Domänen (Keating et al. 2002) oder mit benachbarten Domänen (Samel 2007) wurde die Faltung der C-Domäne aufgeklärt. Die beiden Subdomänen bilden eine V-förmige Struktur, welche an der Basis durch einen α -helikalen Linker verbunden ist. Nahe des Linkers zwischen den beiden Subdomänen befindet sich die aktive Stelle mit dem konservierten HHxxxDG-Motiv. Zwischen den beiden Untereinheiten bildet sich ein Kanal, den die Pantetheinarme der beiden T-Domäne jeweils von einer Seite durchqueren müssen, um die Substrate zum aktiven Zentrum zu bringen. Dabei wird zwischen einer Spender und Akzeptor-Seite unterschieden (Belshaw et al. 1999).

Das Peptidyl-Intermediat wird von einer N-terminal gelegenen T-Domäne auf das C-terminal an der T-Domäne gebundene Monosubstrat übertragen. Für diesen Prozess greift die α -Amingruppe des *downstream* gebundenen Aminoacylrests die Thioesterbindung zwischen dem Peptidylrest und der T-Domäne an. Die somit entstandene verlängerte Peptidkette bleibt an der downstream T-Domäne gebunden und die upstream gelegene T-Domäne kann erneut beladen werden.

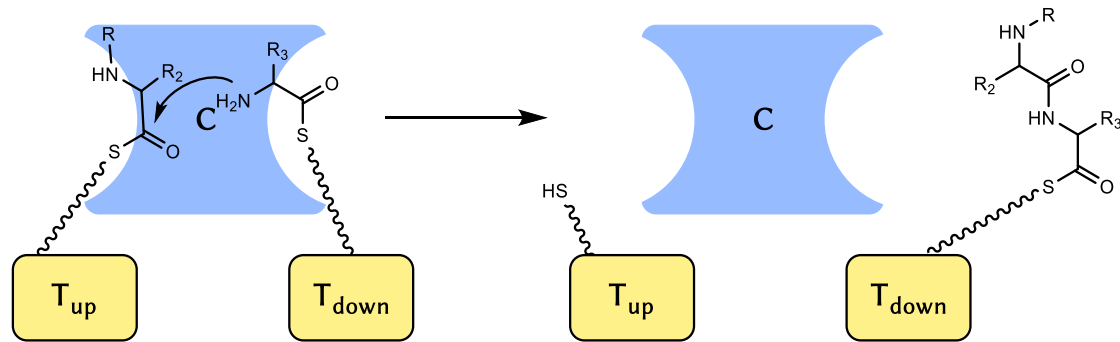


Abbildung 1-13: Durch die C-Domäne katalysierte Peptidbindungsreaktion. Die an die T-Domänen gebundenen Substrate werden über die Spender und Akzeptor-Seite zum katalytischen Zentrum der C-Domäne transportiert. Dort erfolgt der Angriff der Aminogruppe des Nukleophils auf die Thioesterbindung des Elektrophils. Die verlängerte Peptidkette wird schließlich zu einer weiteren katalytischen Domäne geleitet, während die *holo*-T-Domäne erneut beladen werden kann.

Obwohl die meisten A-Domänen durch die spezifische Selektion der Substrate den Aufbau der Peptidkette bestimmen, können auch die C-Domänen eine hohe Substratspezifität aufweisen und die Biosynthese des Peptides kontrollieren (Belshaw et al. 1999; Bloudoff et al. 2016; Kraas et al. 2012; Linne and Marahiel 2000; Rausch et al. 2007).

In Pilzen erfolgt die Freisetzung makrozyklischer NRPs wie z.B. bei der Biosynthese von Cyclosporin durch eine C-Domäne, anstelle der typischerweise in bakteriellen NRPS gefunden TE-Domäne (vergl. Kapitel 1.2.5.1) (Gao et al. 2012). Diese als C_T bezeichneten Domänen ähneln in ihrer strukturellen Komposition den kanonischen C-Domänen (Zhang et al. 2016). Neben einer allgemein kompakteren Struktur ist der Verschluss der Bindetasche für das Akzeptor-Molekül das wesentlichste Unterscheidungsmerkmal. Wie andere C-Domänen sind auch C_T -Domänen auf die für die Präsentation der Peptidyl-Kette durch die T-Domäne angewiesen. Biochemische Studien der C_T -Domänen haben gezeigt, dass die intramolekulare Zyklisierung an dem an der T-Domäne gebundenen Aminoacyl-Intermediat stattfindet (Gao et al. 2012; Parkinson et al. 2018).

1.2.5. Optionale Domänen

Die Strukturdiversität der NRPs beruht aber nicht nur auf diesen drei Domänen sondern stützt sich auf eine Reihe weiterer Domänen. Diese sogenannten Hilfsdomänen (*engl.: auxiliary domains*) können in dem jeweiligen Modul zwischen zwei Domänen liegen, in eine andere Domäne eingebettet sein, den C-Terminus der NRPS bilden oder als eigenständiges Protein freistehend vorliegen. So vielfältig wie ihre Lage in den NRPS-Systemen sind auch ihre Funktionen. In den folgenden Kapiteln werden einige der häufiger vorkommenden Hilfsdomänen beschrieben.

1.2.5.1. Thioesterase-Domäne

In vielen Fällen beendet eine am C-Terminus des letzten Moduls gelegene Thioesterase(TE)-Domäne die Biosynthese des NRP, indem sie die Freisetzung des Peptides von der NRPS-Maschinerie katalysiert. Dabei werden zwei Arten von Thioesterasen unterschieden. Die im letzten Modul des NRPS Enzym integrierten TE-Domänen (Typ I), die die Abspaltung des fertigen Peptides von dem Enzym katalysieren und die im Gencluster der NRPS kodierten aber ansonsten alleinstehenden Thioesterasen (Typ II). Der zweite Typ an Thioesterasen kann eine Reihe der NRPS-Prozesse beeinflussen (Kotowska and Pawlik 2014), und wie der Typ I für die Freisetzung von Produkten verantwortlich sein (Matsuda et al. 2019). Der Typ II wirkt allerdings überwiegend als ein Reparatur-Mechanismus, der für die Erkennung und Regeneration von falsch beladenen T-Domänen verantwortlich ist (Koglin et al. 2008; Schwarzer et al. 2002; Yeh et al. 2004).

Die geringe Selektivität einiger PPTasen wie Sfp kann zu einer Fehlbeladung der T-Domänen während der posttranslationalen Modifikation führen, da große Mengen des Coenzym A in einer Zelle acetyliert vorliegen können (Leonardi et al. 2005). Folglich steht die Thiolgruppe des Ppant-Arms nicht für die Aufnahme einer Aminosäure zur Verfügung und muss durch Hydrolyse freigesetzt werden. Die Bindung eines falschen Monomers an den Ppant Arm kann infolge der Selektion anschließender Domänen ebenfalls zu einer Stagnation der NRPS-Maschinerie führen. Auch in diesem Fall hydrolysieren die Typ II Enzyme den Thioester und geben die T-Domänen bzw. Ppant-Kofaktoren wieder für die Aufnahme einer korrekten Aminosäure frei.

Die etwa 200-250 AS langen Thioesterasen-Domänen gehören gemeinsam mit den Serinproteasen, den Lipasen und Esterasen zu der Familie der α/β -Hydrolasen. Die Faltung wurde mittlerweile anhand Kristallstruktur von sowohl isolierten Thioesterasen des Typ I (Bruner et al. 2002; Samel et al. 2006) und Typ II (Koglin et al. 2008) als auch von TE-Domänen im Verband mit ihrem Modul (Frueh et al. 2008; Miller et al. 2016; Tanovic et al. 2008) bestimmt. Sie weisen ein zentrales β -Faltblatt auf, welches aus sieben Strängen besteht. Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der α / β -Hydrolase-Familie (Holmquist 2000), fehlt den NRPS TE-Domänen der erste N-terminale β -Strang. Sechs der β -Faltblatt-Stränge sind parallel zueinander angeordnet und der verbleibende Strang ist antiparallel. Auf diese Weise entsteht ein zentrales β -Faltblatt, das von α -Helices umgeben ist. Die so gebildete schüsselförmige Struktur wird von einer Art Deckel abgeschlossen, welche aus weiteren zwei bzw. drei Helices besteht. Anhand der Kristallstruktur der TE-Domäne in dem SfrA-C Modul der Surfactin Synthetase aus *Bacillus subtilis* wurden zwei unterschiedliche Konformationen in den beiden

Molekülen in der asymmetrischen Einheit für die Deckelstruktur beobachtet (Bruner et al. 2002) und als offen bzw. geschlossen bezeichnet (Abbildung 1-14). NMR-Studien und Kristallstrukturanalysen des Terminationsmoduls der Enterobactin-Synthetase EntF stützten die Theorie der flexiblen Gestaltung der Deckelstruktur und gaben einen Einblick in die Interaktion der T-TE-Domänen (Frueh et al. 2008; Liu et al. 2011). Die Studien zeigten, dass der Ppant-Arm bei geöffneter Konformation in die schüsselartige Struktur der TE-Domäne eindringt, sodass die katalytischen Zentren in räumliche Nähe kommen. Der nucleophile Angriff durch externe Moleküle wird durch schließen des Deckels verhindert.

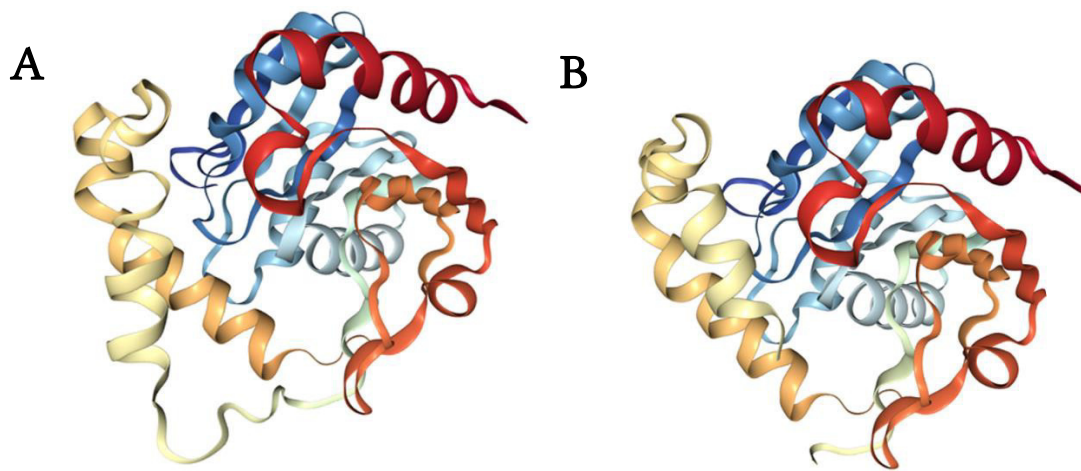


Abbildung 1-14: Struktur der TE-Domäne von SrfAC in A) der offen und B) geschlossenen Form (PCB-Code:1JMK)

Das biologisch aktive Zentrum der TE-Domänen besitzt eine katalytische Triade aus einem Serin in einem konservierten GxSxG-Motiv, einem Histidin und einem Aspartat. In seltenen Fällen ist statt eines Serin ein Cystein als Nucleophil in der Triade zu finden. Da in Mutationsstudien an den TE-Domänen der Sulfazecin-Synthase und Obafluorin-Synthase das Cystein essentiell für die Bildung des β -Lactom-Rings war, wurde vermutet, dass es spezifisch für die Bildung dieser Ringsysteme ist (Oliver et al. 2018; Schaffer et al. 2017).

Unabhängig von der Aminosäure führt die katalytische Triade infolge der Polarisierung der Seitenkette des Serins (Cysteins) zu der Bildung eines reaktiven Oxyanion. Die Stabilisierung dieses Übergangszustand seitens eines aus dem Amidruckgrat der Bindungstasche gebildeten Oxyanion-Lochs, konnte anhand der strukturelle Charakterisierung der TE-Domäne von Fengycin nachgewiesen werden (Samel et al. 2006). Der eigentliche Freisetzung-Prozess beginnt, indem das Oxyanion die Thioester-Verbindung der terminalen Peptidyl-T-Domäne angreift und das Peptid auf diese Weise als Acyl-Oxoester kovalent an die TE-Domäne bindet (Abbildung 1-15) (Du and Lou 2010). Im Anschluss erfolgt durch Hydrolyse oder Makrozyklisierung die Abspaltung des Peptides. Hierbei ist ein

nukleophiler Angriff durch ein Wassermolekül wodurch dem ein lineares Produkt resultiert wie beispielsweise bei der Freisetzung von Vancomycin (Hubbard and Walsh 2003) oder Feglymicin (Gonsior et al. 2015) eher selten. Üblicher ist eine intramolekularer Angriff durch ein Amin (vom N-terminus oder einer der Seitenketten des Oligopeptides) oder durch eine Hydroxyl-Gruppe (von der Seitenkette des Oligopeptides). Dabei kommt es zu einer Makrozyklisierung oder einer verzweigten Zyklisierung (Abbildung 1-15).

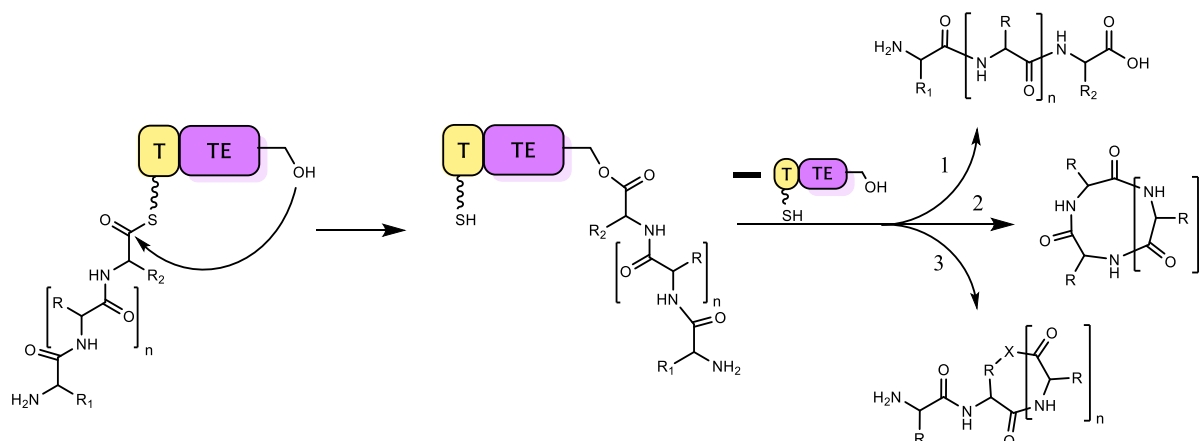


Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der durch die TE-Domäne katalysierten Reaktionen. Übertragung des Oligopeptids und anschließende Produktfreisetzung über (1) Hydrolyse mit Wasser, (2) Makrozyklisierung oder (3) verzweigte Zyklisierung.

Die TE-Domänen von NRPS haben überwiegend eine sehr geringe Substratspezifität und vollziehen die Freisetzung der Peptide trotz kleiner Veränderungen in den Strukturen der Oligopeptide (Horsman et al. 2016). Bei Modifikationen, die kurz vor der Freisetzung an den terminalen T-Domänen durchgeführt werden, agieren die TE-Domänen jedoch als Kontrollmechanismus. So werden beispielsweise Nocaridicin und Pyochelin bei fehlendem β -lactam Ringschluss bzw. fehlender Methylierung nicht von der NRPS-Maschinerie freigesetzt (Gaudelli and Townsend 2014; Patel and Walsh 2001) und die Aktivität der Teicoplanin TE-Domäne wird bei fehlenden Ringschlüssen des Intermediates stark gehemmt (Peschke et al. 2018). Eine weitere Alternative zur Freisetzung der NRP bilden Reduktase(R)-Domänen, die das lineare Peptid bei der Abspaltung zu einem Aldehyd oder primärem Alkohol reduzieren.

1.2.5.2. Reduktase

Eine ebenfalls in NRPS-System prominente Strategie zur Produktfreisetzung wird über die Reduktase(R)-Domänen vermittelt. Wie die TE- oder C_T-Domänen befinden sich auch die für die Abspaltung des NRP verantwortlichen R-Domänen als letzte C-terminale Domäne in dem Terminationsmodul, wie beispielsweise in dem an der Biosynthese von Myxochelin A beteiligten MxcG aus *Stigmatella aurantiaca* (Li et al. 2008b) oder der Saframycin-A-Synthase

aus *Streptomyces lavendulae* (Li et al. 2008a; Peng et al. 2012). Bei der Freisetzung werden die kovalent an den T-Domänen gebundenen Peptidylthioester durch eine zwei- oder vier-Elektronen-Reduktion zu freien Aldehyden bzw. primären Alkoholen reduziert (Du and Lou 2010; Manavalan et al. 2010). Dabei sind sie nicht zwangsläufig an die Bereitstellung der Intermediate durch die T-Domäne angewiesen (Chhabra et al. 2012; Read and Walsh 2007).

Die strukturelle Charakterisierung der NAD(P)H-abhängigen R-Domänen offenbarte eine Untergliederung in zwei Untereinheiten (Chhabra et al. 2012; Kinatukara et al. 2016; Wyatt et al. 2012). Der etwa 280 Aminosäuren lange N-terminale Teil der R-Domäne zeichnet sich durch eine Rossmann-Falte mit einem konservierten NAD(P)H-Bindemotiv (TGxxGxxG) aus und der aus ca. 150 Aminosäuren bestehende C-terminale Teil ist für die Erkennung und korrekte Positionierung der Substrate verantwortlich. Anhand der strukturellen Organisation lassen sich die R-Domänen der Proteinfamilie der Kurzketten-Dehydrogenasen/Reduktasen (*short-chain dehydrogenase/reductases* = SDR) zuordnen (Kavanagh et al. 2008), obwohl der kinetischen Parameter nicht dem typischen Reaktionsablauf dieser Enzymgruppe entspricht (Haque et al. 2014).

1.2.5.3. Epimerisierungsdomänen

Die Mehrheit der durch NRPS assemblierten Naturstoffe enthält _D-konfigurierte Aminosäuren, die eine Reihe von biologischen Eigenschaften beeinflussen, wie z.B. den proteolytischen Abbau der Peptide hemmen (Genchi 2017). Nur in wenigen Fällen wird die _D-Aminosäure direkt durch eine A-Domäne aktiviert (Hoffmann et al. 1994). Meist wird die Stereometrie der Aminosäure nach der Übertragung an die T-Domäne von intramodularen Epimerisierung (E)-Domäne umgewandelt, die zwischen der T- und der C-Domäne verankert sind (Hai et al. 2019). Diese etwa 400 Aminosäuren umfassenden Domänen finden sich beispielweise in den NRPS-Systemen von Surfactin oder Gramicidin S (Kraas et al. 2010; Stein et al. 1995).

Strukturell sind E-Domänen eng mit den C-Domänen verwandt. Wie am Beispiel von TycA, dem Initiationsmodul der Tyrodidin-Synthase und GrsA gezeigt wurde, bilden die beiden Untereinheiten wie auch die C-Domänen ein V-förmiges Pseudodimer mit einem Tunnel durch den die T-Domäne das Substrat zum katalytischen Zentrum bringt (Chen et al. 2016; Keating et al. 2002; Samel et al. 2014). Die katalytische Funktion ist ebenfalls von einem hochkonservierten Histidin-Rest in einem HHxxxD-Motiv aber auch von einer konservierten Glutaminsäure abhängig (Kim et al. 2019; Stachelhaus and Walsh 2000).

Neben den reinen E-Domänen gibt es auch duale C/E-Domänen, die außer der Peptidbindung auch noch eine stereoisomerische Transformation katalysieren können. Sie ersetzen im jeweiligen Modul die C-Domäne und besitzen ein zweites HHxxxD-Motiv (Balibar et al. 2005; Rausch et al. 2007). Vor kurzem konnte für die TE-Domänen in der Nacardicin-Synthase ebenfalls eine intrinsische Epimerisierungsaktivität nachgewiesen werden, obwohl sie die typische strukturelle Organisation einer TE-Domäne aufweist (vergl. Kapitel 1.2.5.1) (Patel et al. 2019).

1.2.5.4. Methylierungsdomänen

Eine weiter häufig vorkommende Modifikation sind Methylierungen der NRP, die unter anderem die Bioverfügbarkeit des Peptides steigern und die proteolytische Suszeptibilität senken. Die in NRP vorkommenden N-, O- oder S-Methylierungen werden meist von in sogenannten unterbrochenen A-Domänen integrierten Methylierungs(MT)-Domänen katalysiert. Diese MT-Domänen sind häufig zwischen dem A8 und A9 Motiv der A_{Sub}-Domäne (Patel and Walsh 2001), aber auch zwischen dem A2 und A3 Motiv der A_{Kern}-Domäne (Al-Mestarihi et al. 2014; Huang et al. 2018) lokalisiert. Mutationssexperimente haben gezeigt, dass ein Austausch von MT-Domänen zwischen verschiedenen Enzymen trotz geringer Homologien möglich ist (Mori et al. 2018). Auch die Herstellung einer ununterbrochenen, funktionalen A-Domäne durch die Deletion MT-Domäne (Shrestha and Garneau-Tsodikova 2016) sowie die gegenteilige Integration einer MT-Domäne in eine zuvor kontinuierlichen A-Domäne wurde anhand von verschiedenen Studien nachgewiesen (Lundy et al. 2019).

1.2.6. Modifikationen von NRPS

Wie schon bevor erwähnt macht der modulare Aufbau und die meist autonome Funktion der einzelnen Domänen bzw. Module die NRPS-Systeme zu potentiell programmierbaren Synthese-Maschinen. So ist es theoretisch durchaus vorstellbar, aus einzelnen Domänen ein völlig neues Enzym zu konstruieren, das die gewünschte Struktur mit einer definierten Länge synthetisiert. Allerdings stellt schon die Synthese von veränderten Peptiden eine Herausforderung dar, da zwar die Domänen strukturell und biochemisch gut untersucht sind, die Mechanismen und Interaktionen, die hinter den komplexen Synthesen stehen noch nicht ausreichend aufgeklärt sind. So konnten zwar alternative Produkte für den Austausch der A-Domäne in dem Initiierungs- bzw. dem Terminationsmodul der Surfactin Synthase detektiert werden, jedoch in sehr geringen Mengen im Vergleich mit dem Original (Schneider et al. 1998; Stachelhaus et al. 1995). Um die intramodularen Interaktionen der

Domänen nicht zu beeinflussen wurden auch Einheiten aus zwei Domänen (A-T bzw. C-A) oder kompletten Modulen (C-A-T) ausgewechselt. Die geschieht meist mit drastisch reduzierten Ausbeuten des modifizierten Produktes (Calcott et al. 2014). Eines der erfolgreicher Beispiele ist die Substitution der dptD Module aus der Biosynthese von Daptomycin mit Modulen aus verwandten Lipopeptid-Synthasen. Die Ausbeute der durch die Hybrid-Enzyme gebildeten Produkte lag bei maximal etwa 50% (Miao et al. 2006; Nguyen et al. 2006). Sehr erfolgreich war hingegen der Austausch von A-T-C-Modulen, die als XU-Einheit (*eXchange Unit*) bezeichnet wurde (Bozhüyük et al. 2018). Bei diesem Austausch muss jedoch die Substratspezifität der *downstream* gelegenen C-Domäne beachtet werden.

Die Identifizierung des nicht-ribosomalen-codes und die Aufklärung der Struktur der A-Domänen (s. Kapitel 1.2.2) eröffnete die Möglichkeit Untereinheiten oder einzelne Aminosäuren in der Bindetasche von A-Domänen zu modifizieren und so die Spezifität zu beeinflussen ohne intramodularen Interaktionsflächen der A-Domäne mit anderen Domänen zu verändern (Stanišić and Kries 2019). Auch diese Strategien wurden durch mehrere Studien bestätigt, ohne jedoch das Problem der reduzierten Produktausbeute zu überwinden. (Kries 2016; Niquille et al. 2018; Villiers and Hollfelder 2011).

1.3. Nichtribosomale Peptidsynthetase-ähnliche Enzyme

NRPS-ähnliche Enzyme bestehen, im Gegensatz zu den meistens sehr komplexen NRPS-Systemen nur aus einem einzigen Modul, welches drei Domänen beinhaltet. Das Hauptunterscheidungsmerkmal ist jedoch das Fehlen einer C-Domäne und folglich die Fähigkeit Peptidbindungen zu generieren. Anstatt der C-Domäne ist in NRPS-ähnlichen Proteinen am C-Terminus entweder eine TE-Domäne oder eine R-Domäne präsent, die sowohl die enzymatische Funktion als auch die Freisetzung des Produktes übernehmen.

1.3.1. NRPS-ähnliche Carboxylsäure Reduktasen

NRPS-ähnliche Enzyme mit einer C-terminalen R-Domäne katalysieren ATP und NADPH-abhängig die Umwandlung von Carbonsäuren zu ihren zugehörigen Aldehyden (vergl. Kapitel 1.2.5.2). So zeigen Deletionsexperimente in *Aspergillus flavus*, dass LnaA und LnbA die Reduktion von Tyrosin katalysieren (Forseth et al. 2013). In *Stachybotrys bisbyi* reduziert StbB, als letzten Schritt in der Illicolin B Synthese, die Grifolsäure (Li et al. 2016). Das Gen ATEG_03630 kodiert für ein NRPS-ähnliches Enzym, welches für die Reduktion von 5-Methyl-Orsellinsäure in *A. terreus* verantwortlich ist (Wang et al. 2014; Wang and Zhao

2014). Strukturell weisen NRPS-ähnliche mit einer A-T-R Architektur eine große Ähnlichkeit mit den Carbonsäure Reduktasen (*ccarboxylic acid reductase*; CAR) auf, die ebenfalls eine A-T-R Struktur besitzen (Gahlloth et al. 2017; Venkitasubramanian et al. 2007; Winkler 2018). Sequenzvergleiche von R-Domänen aus NRPS-System mit CAR ergaben Ähnlichkeit von 30-50 % (Stothard 2000). Dabei ist zu beachten, dass die überwiegende Mehrheit der CARs aus Actinobakterien stammt, die sich stark von pilzlichen CARs unterscheiden und einer eigenen Untergruppe zugeordnet werden (Horvat et al. 2019; Stolterfoht et al. 2018). Wahrscheinlich bilden die NRPS-ähnlichen Enzyme mit der A-T-R Struktur einen Teil der CAR's. So wurden beispielsweise StbB und ATEG_03630 in neueren Übersichtsartikeln dem Typ II der CAR's zugeordnet (Butler and Kunjapur 2020; Derrington et al. 2019).

1.3.2. NRPS-ähnliche Enzyme mit einer A-T-TE Architektur

Von NRPS-ähnlichen Proteinen mit einer A-T-TE Strukturen sind bisher nur Vertreter bekannt, die aromatische α -Ketosäuren als Substrat nutzen. Auch bei diesen Enzymen wird das Substrat spezifisch durch die A-Domäne erkannt und unter ATP-Verbrauch aktiviert (Abbildung 1-16). Das Anhydrid wird an die T-Domäne weitergereicht und als Thioester durch den Schwefel des Phosphopantetheinarms gebunden. Im Gegensatz zu NRPS überträgt die T-Domäne in NRPS-ähnlichen Enzymen das zuerst gebundene Substrat weiter an die TE-Domäne, an der es als Ester gebunden wird. Durch Mutationen in der TE-Domäne von TdiA (*Aspergillus nidulans*), dem ersten charakterisierten Vertreter mit einer A-T-TE Architektur, wurde nachgewiesen, dass das erste Indolpyruvat von dem Serin 774 aufgenommen wird (Balibar et al. 2007; Bok et al. 2006). Eine zweite Ketosäure wird anschließend von der A-Domäne aktiviert und an die T-Domäne übertragen (Abbildung 1-16). Die zwei Substratmoleküle werden von der TE-Domäne miteinander verbunden und letztlich von dem Enzym freigesetzt.

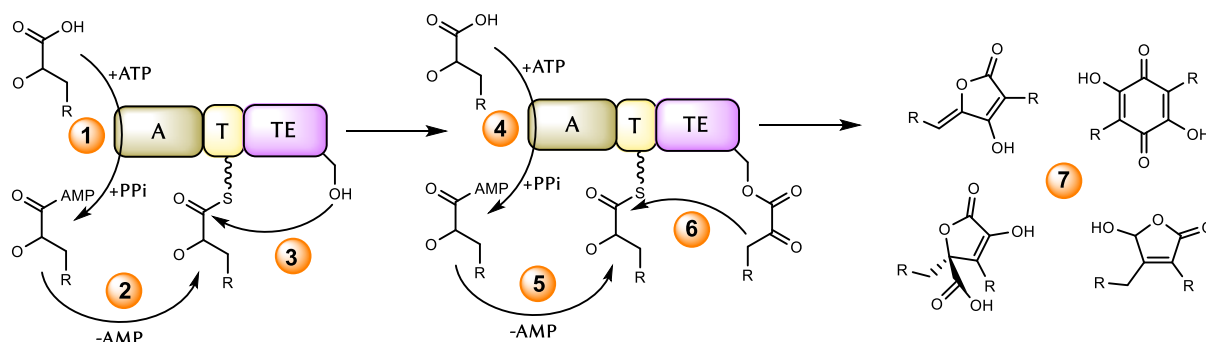


Abbildung 1-16: Schematische Darstellung des Reaktionsweges von NRPS-ähnlichen Enzymen. Die A-Domäne aktiviert unter ATP-Verbrauch eine α -Ketosäure (1) und überträgt sie auf die T-Domäne (2). Vor dort wird die Säure auf die TE-Domäne übertragen (3). Eine weitere α -Ketosäure mit dem gleichen Rest wie die erste wird von der A-Domäne aktiviert (4) und an die T-Domäne gebunden (5). Die TE-Domäne katalysiert die Verknüpfung der beiden Säuren und die Zyklisierung und setzt schließlich das Produkt frei (6). Abhängig von der TE-Domäne können dabei unterschiedliche Ringsysteme gebildet werden (7). R=Phenyl-, 4-Hydroxyphenyl oder Indol-Rest.

Die meisten der bisher beschriebenen Vertreter der NRPS-ähnlichen Enzyme sind an der Biosynthese von Quinonen beteiligt. Dazu gehören neben TdiA, das Indolylpyruvat als Substrat verwendet, die Atromentin-Synthasen Gre A aus *Suillus grevillei* (Wackler et al. 2012), InvA1, InvA2 und InvA5 aus *Paxillus involutus* (Braesel et al. 2015) und AtrA aus dem Basidiomyceten *Tapinella panuoides* (Schneider et al. 2008), sowie die für die Biosynthese von Polyporsäure verantwortliche EchA aus *Streptomyces* sp. LZ35 (Zhu et al. 2014). Im Fall der Bildung eines Quinones erfolgt die Bindung der Substrate über eine doppelte Claisen-Kondensation, die zur Bildung zweier C-C-Bindungen führt (Balibar et al. 2007; Schneider et al. 2007). Des Weiteren konnten mit der Ralfuranon-Synthase (RalA) aus *Ralstonia solanacearum* (Wackler et al. 2011) und dem für die Biosynthese von Micorperfuranon beteiligte MicA aus *Aspergillus nidulans* (Yeh et al. 2012) zwei Furanon Synthasen identifiziert werden, die eine C-C und eine C-O-Bindung katalysieren.

Im Genom von *A. terreus* wurden fünf NRPS-ähnliche Gene mit einer TE-Domäne identifiziert (Guo and Wang 2014). Anhand von Deletionsstudien konnten mit BtyA und ApvA, die die Grundgerüste der Butyrolactone bzw. Aspulvinon synthetisieren, zwei weitere Furanone-Synthasen identifiziert werden. AtqA wurde als eine weitere Bisindolylbenzochinonesynthetase identifiziert (Guo et al. 2013a). Die Deletion von MelA führte zu einer Störung in der Pigmentsynthese in den Sporen, das Produkt von MelA blieb jedoch unbekannt.

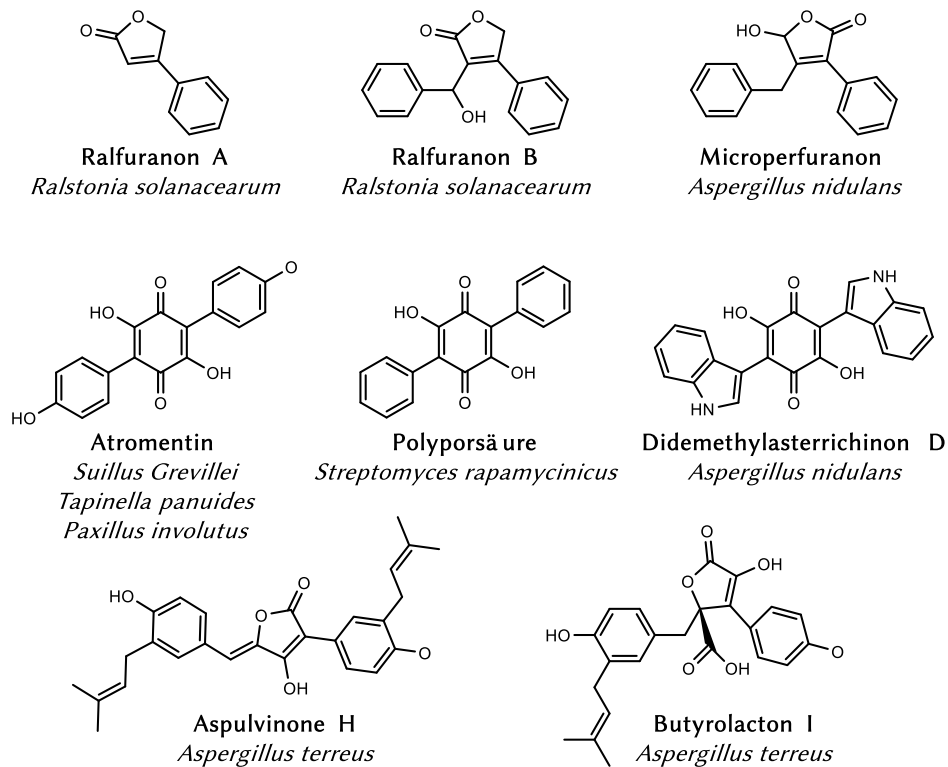


Abbildung 1-17: Beispiele für Sekundärmetabolite aus Pilzen, deren Grundstrukturen auf die Biosynthese durch NRPS-ähnliche Enzyme zurückzuführen sind.

Trotz inzwischen einiger charakterisierter Enzyme wurde der genaue Mechanismus für die Bildung des Ringes durch die TE-Domäne bisher nicht aufgeklärt. Braesel et al (2015) stellte die These auf, dass eine katalytische Triade also eine Dreiergruppe aus einem Serin, Asparagin und einem Histidin für die Bildung von Quinone zuständig ist. Dabei sollte das Asparagine von einer aliphatischen Aminosäure und zwei Prolinen befolgt werden. Bei der Bildung von einer Struktur mit einem Furanonkern sollte das Asparagin mit einer Asparaginsäure getauscht sein.

1.4. Prenyltransferasen

Prenyltransferasen katalysieren die Übertragung von unterschiedlichen aktivierten Terpeneinheiten auf eine Vielzahl verschiedener Akzeptoren. Die von diesen Enzymen verwendeten Prenyl-Einheiten werden letztendlich aus den C5-Bausteinen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) gebildet und stammen je nach Organismus aus dem Mevalonat- oder dem Methylerythritolphosphatweg. Der Transfer einer Prenyleinheit beginnt immer mit der Abspaltung des Diphosphats von dem Prenyldonor, wodurch ein reaktives Carbeniumion entsteht. Dieses greift anschließend elektrophil das Akzeptor Substrat an. Je nach Lokalisation der positiven Ladung kann die

Prenyl-Einheit regulär über das C-1 oder revers über das C-3 Atom gebunden werden (Abbildung 1-18).

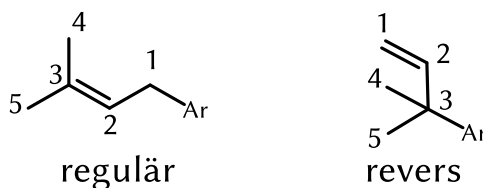


Abbildung 1-18: Reguläre und reverse Prenylierung am Beispiel von DMAPP. Ar = beliebiger Aromat

Die Prenyltransferasen tragen zur Diversität und biologischen Aktivität der Moleküle bei und bilden somit eine wichtige Enzymklasse im Primär- und Sekundärmetabolismus der Organismen (Winkelblech et al. 2015a). Die Prenyltransferasen werden im Hinblick auf ihre Akzeptormoleküle in drei große Gruppen eingeteilt.

Die Isoprenyldiphosphatsynthasen (IPPS) verknüpfen die Isomere DMAPP und IPP zunächst zu Geranyldiphosphat (GPP, C10), welches durch fortlaufender Kondensation mit den IPP zu langgliedrigen Ketten, wie beispielsweise Farnesyldiphosphat (FPP, C15) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, C20) verlängert wird. Die magnesiumabhängigen Enzyme lassen sich gemäß der Konfiguration ihrer Produkte in *cis*- und *trans*-IPPS einteilen (Nagel et al 2018).

Die durch die IPPS synthetisierten Isoprenyl-Einheiten (oftmals FPP oder GGPP) dienen wiederum von der Gruppe der Proteinprenyltransferasen zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Dabei wird die Prenyleinheit auf das Schwefelatom eines Cysteins im C-terminalen Bereich des Proteins übertragen und ermöglicht so die Integration von zuvor hydrophilen Proteinen in die Zellmembran (Nguyen et al 2010). Diese Art an Prenylierung findet sich an Ras-, Rab- und anderen GTP-bindenden Proteinen und Proteinkinasen, die häufig an der Signalweiterleitung in Zellen verantwortlich sind.

Die dritte Gruppe bilden die aromatischen Prenyltransferasen, mit denen im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde. Deshalb wird auf diese Gruppe nachfolgend näher eingegangen.

1.4.1. Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische PTasen katalysieren den Transfer von Prenyl-Gruppen auf ein aromatisches Akzeptormolekül, wobei vor allem DMAPP aber auch GPP und FPP als Prenyl-Donoren verwendet werden. In der Regel finden die Prenylierungen an den Kohlenstoff- oder Stickstoffatomen der Aromaten statt. Es gibt aber auch Beispiele für Prenylierungen an aromatisch gebundenen Hydroxy- oder Thiolgruppen (Rudolf and Poulter 2013; Wunsch et

al. 2015). Im Vergleich zu ihrem nicht prenylierten Vorläufer wird infolge des lipophileren Charakters zumeist die biologische Aktivität der prenylierten Substanz gesteigert (Elshahawi et al. 2017; Wollinsky et al. 2012). Ferner dienen die Prenyl-Ketten als Angriffspunkte für zusätzliche Modifikationen wie Oxidationen, Zyklisierungen oder Acetylierungen (Liu et al. 2016; Raju et al. 2011; Tagami et al. 2014).

Die Vielfalt der aromatischen Akzeptoren und deren verschiedene Prenylierungspositionen führen auch zu einer breiten Heterogenität der aromatischen PTasen selbst. So können sie diverse Bindemotive aufweisen, ihre katalytische Aktivität von Kationen unabhängig oder vollständig ionenabhängig sein und Membrangebunden oder in löslicher Form vorliegen. In Bezug auf ihre strukturellen Organisation und katalytischen Motiven werden die aromatischen PT's in verschiedene Familien und Gruppen eingeteilt (Abbildung 1-19).

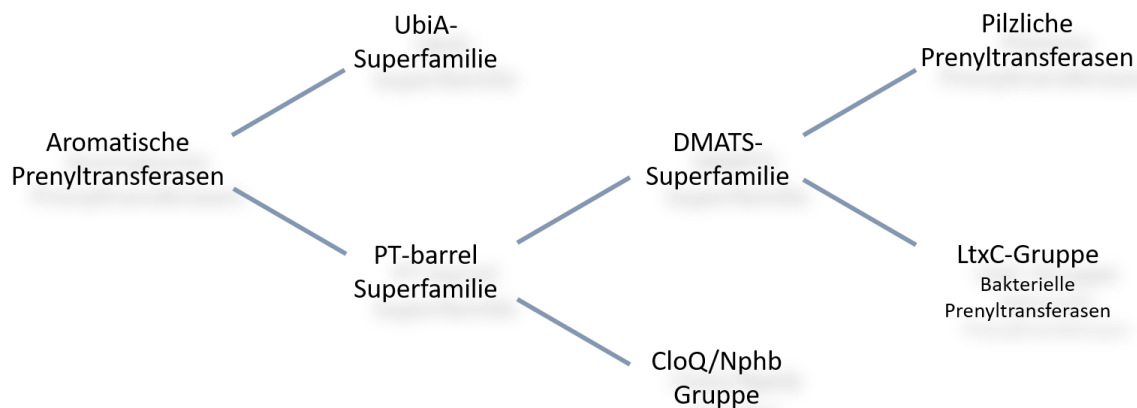


Abbildung 1-19: Einteilung aromatischer Prenyltransferasen

Die Mitglieder der UbiA-Superfamilie sind membrangebunden, abhängig von divalenten Kationen, wie Mg^{2+} (Ohara et al. 2009) und besitzen ein aspartatreiche, hoch konservierte NDxxDxxxD-Motiv (Li 2016). Sie kommen in allen Reichen des Lebens vor und stehen oft im Zusammenhang mit dem Primärstoffwechsel. Dort spielen sie beispielsweise in der Biosynthese der Ubichinone und Menachinone eine Rolle, wie auch der Namensgeber der Familie, das UbiA aus *Escherichia coli* und COQ2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ashby et al. 1992; Forsgren et al. 2004).

Die löslichen Enzyme der PT-barrel Superfamilie sind in Pilzen und Bakterien zu finden. Sie enthalten keine bisher bekannten gemeinsamen Sequenzmotive, formen aber durch die fünffache Wiederholung von $\alpha\beta\beta\alpha$ -Elementen eine ähnliche Tertiärstruktur (Tello et al. 2008). Die insgesamt zehn antiparallel angeordneten Faltblätter bilden einen zentralen Zylinder, der von einem Ring von Helices nach außen abgeschirmt wird. Mit über 50 biochemisch charakterisierten Proteinen ist die Familie der Dimethylallyltryptophan-

synthasen (DMATS) im Moment die am besten untersuchteste Gruppe dieser Enzymklasse (Awakawa et al. 2018; Chen et al. 2017; Pan et al. 2018; Winkelblech et al. 2015a; Wohlgemuth et al. 2018; Wong et al. 2018).

1.4.1.1. Die DMATS Superfamilie

In *Claviceps purpurea* wurde mit DmaW, welches den ersten Schritt in der Biosynthese von Ergotalkaloiden katalysiert, das erste Enzym der DMATS Superfamilie charakterisiert (Tsai et al. 1995). Es überträgt DMAPP auf das C-4-Atom des Indolrings von Tryptophan. Die Identifizierung von FgaPT2 als das DmaW Orthologe aus *A. fumigatus* (Unsöld and Li 2005) markierte den Beginn einer intensiven Erforschung der DMATS-Prenyltransferasen. Bei den DMATS-Prenyltransferasen handelt es sich um lösliche Proteine vornehmlich aus Ascomyceten, die in ihrer Reaktion stets unabhängig von der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen sind. Zahlreiche biochemische Studien belegen deutlich die Promiskuität gegenüber einer Vielzahl von aromatischen Akzeptoren (Fan et al. 2015a; Yang et al. 2020). Anhand ihrer Herkunft werden sie manchmal in zwei Untergruppen unterteilt (Abbildung 1-19), die sich strukturell aber sehr ähnlich sind (Metzger et al. 2009) und darum in der vorliegenden Arbeit nicht unterschieden werden.

Für die überwiegende Mehrheit bilden Tryptophanderivate oder tryptophan-haltige zyklische Dipeptide die natürlichen Substrate. Im Laufe der Zeit konnten regiospezifische Prenyltransferasen für alle Positionen am Indolring identifiziert und charakterisiert werden. (Winkelblech et al. 2015a; Yu and Li 2012)(Abbildung 1-20 A-C).

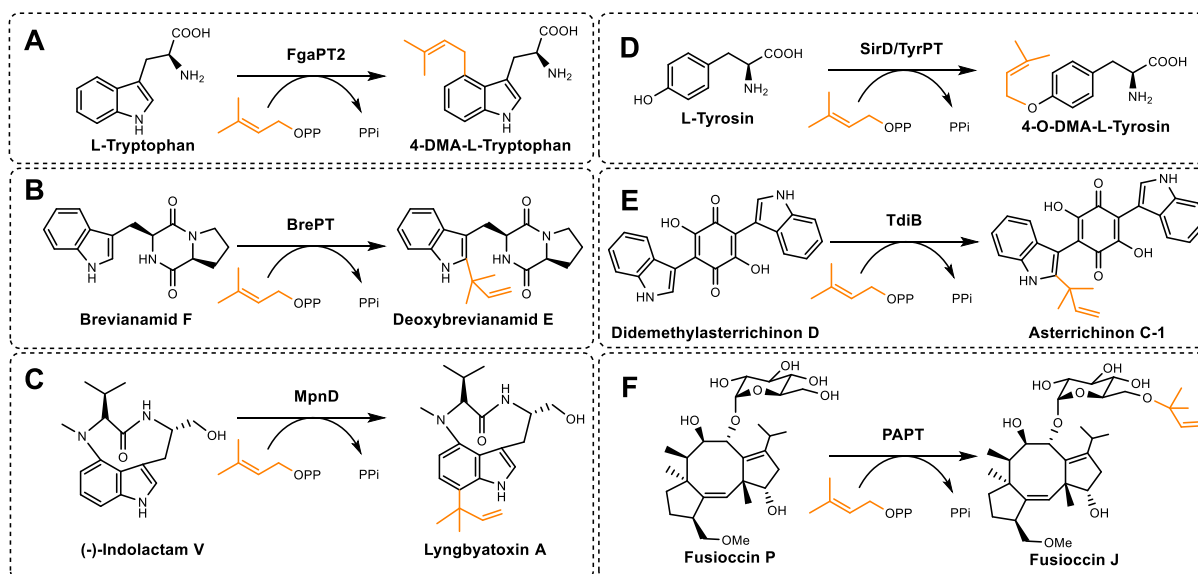


Abbildung 1-20: Ausgesuchte Beispiele für die verschiedenen von DMATS akzeptierten Substrate. A: L-Tryptophan, B/C: Zyklische Dipeptide, D: L-Tyrosin, E: andere Indol-Derivate, F: Nicht-aromatische Substrate

Neben den PTasen aus Ascomyceten, finden sich bakterielle PTase, wie die 6-DMATS aus verschiedenen *Streptomyces* Spezies (Elshahawi et al. 2017; Winkelblech and Li 2014) und LtxC aus *Lyngbya majusculav* (Edwards and Gerwick 2004), TelC aus *Streptomyces blastmyceticus* (Awakawa et al. 2014) und MpnD aus *Marinactinospora thermotolerans* (Ma et al. 2012) in dieser Gruppe. Während die 6-DMATS die C6-Prenylierung von Tryptophan katalysieren, prenylieren LtxC, TelC und MpnD die C7-Position an (-)-Indolactam V (Abbildung 1-20 C). Aber auch andere Indolderivate werden häufig als Substrat verwendet. So katalysieren AtmD aus *A. flavus* und PaxD aus *Penicillium paxilli* die Prenylierung von Indol-Diterpenen und ArdB aus *Aspergillus fischeri* prenyliert ein zyklisches Tripeptid (Haynes et al. 2013; Liu et al. 2013; Liu et al. 2014). Des Weiteren wurde bei der Aufklärung des Terrechinon A Synthese in *A. nidulans* TdiB als Prenyltransferase für Bisindolbenzochinone identifiziert (Abbildung 1 3 E) (Balibar et al. 2007; Schneider et al. 2008b) und in *A. terreus* katalysiert AstA die Prenylierung von Asterichinon D (Tarcz et al. 2014a).

Darüber hinaus übertragen die DMATS-PTasen die Prenyl-Gruppen auch auf andere aromatische Verbindungen. Dazu gehören die beiden Tyrosin O-Prenyltransferasen SirD und TyrPT aus *Leptosphaeria maculans* und *Aspergillus niger* (Abbildung 1-20) (Fan et al. 2014; Kremer and Li 2010). AbpB aus *A. terreus* scheint gleichzeitig sowohl an der Biosynthese von Aspulvinone als auch Butyrolactone beteiligt zu sein (Guo et al. 2015). Weitere Beispiele sind die Prenylierung von Xanthone durch XptB aus *A. nidulans* (Pockrandt et al. 2012) oder die Prenylierung von Flavonoiden durch FoPT1 aus *Fusarium oxysporum* (Yang et al. 2016). Einen sehr außergewöhnlichen Vertreter der DMATS stellt PAPT aus *Phomopsis amygdali* dar, das die Prenyl-Gruppe nicht an den Aromaten, sondern an ein Sauerstoff der Glukose-Einheit von Fusiocin P überträgt (Abbildung 1-20 F) (Noike et al. 2012).

Die überwiegende Mehrheit der DMATS akzeptieren ausschließlich DMAPP als Prenyl-Spender und zeigen eine hohe Regioselektivität bei der Verwendung ihrer natürlichen Substrate. Bei der Verwendung von unnatürlichen Substraten sind die PTasen jedoch deutlich unspezifischer in der Position der Prenylierung (Mai et al. 2019; Winkelblech et al. 2016; Zhou et al. 2017). In *in-vitro* Experimenten mit chemisch synthetisierten DMAPP-Analoga zeigte sich gleichermaßen eine Lockerung der Regiospezifität (Liebhold et al. 2013; Winkelblech et al. 2015b).

Allerdings gibt es einige wenige Ausnahmen für DMATS die andere Prenyl-Donoren wie GPP oder FPP oder sogar mehrere Prenyl-Donoren nutzen. Darunter fallen die an der Biosynthese von Hydroxynaphthalinen beteiligte BAE61387 aus *A. oryzae* (Pockrandt et al. 2014) und die schon erwähnten Enzyme MpnD, TleC, und AstPT (Mori et al. 2016; Tarcz et al.

2014b; Zhou et al. 2016). Während LtxC und VrtC ausschließlich GPP für die Geranylierung ihrer Substrate verwenden (Chooi et al. 2012), akzeptiert AtaPT DMAPP, GPP und FPP als Prenyldonoren (Chen et al. 2017). Mit der Aufklärung der Kristallstrukturen von FgaPT2, FtmPT1 und CdpNPT (Jost et al. 2010; Metzger et al. 2009; Schuller et al. 2012) und der daraus resultierenden Identifikation der Bindetasche wurden Mutagenesen der PTasen möglich (Fan et al. 2015b; Mai et al. 2018; Zhao et al. 2017; Zhou et al. 2016). Mittlerweile konnten alle Positionen am Indolring mit Hilfe von manipulierten DMATS eine Geranyl-Gruppe angefügt werden (Liao et al. 2018).

2. Zielsetzung

Die folgenden Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet werden:

Klonierung und Expression der putativen Gene für die NRPS-ähnlichen Enzyme aus *A. terreus* und EAQ91752 aus *C. globosum*

Die NRPS-ähnlichen Gene ATEG_00700 (*atqA*), ATEG_02004 (*apvA*), ATEG_02815 (*btyA*); ATEG_03090 (*atrA_{At}*), ATEG_03563 (*melA*) und ATEG_08899 (*pgnA*) aus *A. terreus* FGSC A1158 und CHGG_03687 (*astA*) aus *C. globosum* NRRL 1870 sollten heterolog exprimiert und die enzymatischen Produkte identifiziert werden.

Die Arbeitsschritte sollten wie Folgt durchgeführt werden:

- ❖ Amplifikation der NRPS-ähnlichen Gene aus cDNA von *A. terreus* FSA1158 zur Kontrolle der vorhergesagten Intron-Exon Struktur
- ❖ Amplifikation von CHGG_03687 aus gDNA von *C. globosum*
- ❖ Klonierung der codierenden Sequenzen der NRPS-ähnlichen Gene aus *A. terreus* und CHGG aus in den Expressionsvektor pESC-URA mit anschließender Expression der Gene in *S. cerevisiae*
- ❖ Aufreinigung der überproduzierten Proteine zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität
- ❖ Identifizierung und Isolierung der Produkte sowie deren Strukturaufklärung

Zielgerichtete Interenzymatische Domänen Rekombination zur Gewinnung neuer Produkte

NRPS-ähnlichen Enzym besitzen wie auch NRPS autonome Domänen. Eine rekombination der Domänen zwischen den Proteinen sollte die Bildung neuer Substanzen ermöglichen. Um das zu erreichen wurden die Phenylpyruvat, 4-Hydroxypyruvat oder Indolpyruvat verwendeten A-Domänen von ApvA, PgnA bzw. AstA oder AtqA mit den TE-Domänen der verschiedenen Lacton bzw. Chinon bildenden Enzyme kombiniert. Die T-Domänen sollten jeweils von beiden Enzymen abgeleitet werden.

Dafür war der folgende Arbeitsablauf vorgesehen:

- ❖ Amplifikation der A-; A/T-, T/TE- bzw. TE-Domäne mit komplementären Bereichen zu den jeweiligen zukünftig benachbarten Domänen
- ❖ Fusion der amplifizierten Domänen von den NRPS-ähnlichen Genen mittels Homologer Rekombination in *E. coli*
- ❖ Expression der Konstrukte mit den rekombinierten NRPS-ähnlichen Gene in *S. cerevisiae*
- ❖ Aufreinigung und Strukturaufklärung der durch die rekombinierten Enzyme entstandenen Produkte

Koexpression der NRPS-ähnlichen Gene mit den zugehörigen putativen Prenyltransferasen und Analyse der Sekundärstoff in den Transformanten

In der näheren genetischen Umgebung von einigen der zuvor untersuchten NRPS-ähnlichen Enzyme wurden Gene die für putative Prenyltransferasen kodieren gefunden. Die Prenyltransferase Gene sollten zusammen mit den NRPS-ähnlichen Genen in *Saccharomyces cerevisiae* expemiert und die Produkte identifiziert werden.

Vorgesehen waren folgende Arbeitsschritte:

- ❖ Amplifikation der putativen Prenyltransferasen-Gene aus cDNA von *A. terreus* FSA1158 zur Kontrolle der vorhergesagten Intron-Exon Struktur
- ❖ Klonierung der kodierenden Sequenzen der Prenyltransferase Gene in den Clustern der NRPS-ähnlichen Enzyme aus *A. terreus* und *C. globosum* in den Expressionsvektor pESC-HIS
- ❖ Transformation der Plasmide mit den jeweils zugehörigen NRPS-ähnlichen Enzymen
- ❖ Identifizierung und Isolierung der Produkte sowie deren Strukturaufklärung

3. Materialien und Methoden

3.1. Chemikalien, Geräte, Säulenmaterialien für die Chromatographie

3.1.1. Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich und VWR (Radbor, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), AppliChem (Darmstadt), Alfa Aesar (Karlsruhe) und BD (Heidelberg) bezogen.

Tabelle 3-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brilliant Blau R-250	Serva (Heidelberg)
dNTP Mix 100 mM (jeweils 25 mM)	Bioline GmbH (Luckenwalde)
Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie:	Eurisop-Top (Saarbrücken)
Aceton-D ₆ , 99,80% D	
DMSO-D ₆ , 99,80% D	
Methanol-D ₄ , 99,80% D	
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
SYBR® Safe DNA Gel Stain (10000x in DMSO)	Life Technologies (Darmstadt)
Tween® 20	Roth (Karlsruhe)
Glaskugeln (2,85-3,45 mm)	Roth (Karlsruhe)
Glasperlen (1,25 – 1,65 mm)	Roth (Karlsruhe)
CSM-HIS-LEU-URA	MP Biomedicals (Eschwege)

3.1.2. Geräte

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AccuBlock™ Digital Dry Bath Heizblock	Labnet (Edison, USA)
Agilent 1200 HPLC	Agilent (Santa Clara, USA)
Agilent 1260 HPLC gekoppelt mit einem micrOTPF-QIII Massenspektrometer	Bruker Daltonics (Billerica, USA)
Autoklav VX-150	Systemec (Wettenberg)
Brutschrank EB 280	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Denver MAXX Elektronische Präzisionswaage	Denver Instrument (Bohemia, USA)
Ecotron Schüttelinkubator	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
Einkanalpipetten Discovery	Abimed (Langenfeld)
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Bioscience (Corston, UK)

Gefrietrocknungsanlage Alpha 1-2 LD Plus	Martin Crist (Osterode am Harz)
Heraus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heraus Multifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Image Quant 100 Geldokumentationssystem	GE Healthcare (Freiburg)
JOEL ECA-500	JOEL (München)
LLG-unisPEC 2 Spectrophotometer	LLG Labware (Meckenheim)
Membranpumpe	Bacuubrand (Wertheim)
Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle	Bio-Rad (Hercules, USA)
MJ Mini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad (Hercules, USA)
MR Hei-Mix S Magnetrührer	Heidolph (Schwabach)
Multitron Schüttelinkubator	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
My Cycler™ thermal cycler	Bio-Rad (Hercules, USA)
NanoDrop 2000c	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Pioneer™ Precision Balance PA4102C	Ohaus (Greifensee, Schweiz)
PowerPac™ High-Current Power Supply	Bio-Rad (Hercules, USA)
Rocking Platform Shaker	VWR (Radbor, USA)
Rotavapor-R Rotationsverdampfer	Büchi (Flawil, Schweiz)
Sonifier 250	Branson Ultrasonics (Danbury, USA)
Sorval RC 6+ Centrifuge	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Spannungsgeber LKB GPS 200/400	Pharmacia
Sonorex AF 100 Ultraschallbad	Bandelin (Berlin)
ThermoMixer® C	Eppendorf (Hamburg)
UniVapo 100 H Vakuumzentrifuge	UniEquip (Martinsried)

3.1.3. Säulenmaterialien für die Chromatographie

Tabelle 3-3: Verwendetes Material für die Chromatographie

Bezeichnung	Hersteller
Multospher 120 RP18 (Fertigsäulen)	CS Chromatographie Service (Langerwehe)
• 5 µm, 250 x 2 mm	
• 5 µm, 250 x 4 mm	
• 5 µm, 250 x 10 mm	
Protino Ni-NTA Agarose	Macherey Nagel (Düren)
Sephadex G-25 PD-10, NAP5	GE Healthcare (Freiburg)

3.1.4. Kits und Enzyme

Tabelle 3-4: Enzyme, Kits und Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti.Histidine Tagged Protein Mouse mAb	Merck (Darmstadt)
Anti-Mouse IgG (Sigma)	Merck (Darmstadt)
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
DNA MB Grade from fish sperm (Carrier DNA)	Roche (Mannheim)
DNaseI	AppliChem (Darmstadt)
Expand™ High Fidelity PCR System dNTPack	Roche Applied Science (Mannheim)
E.Z.N.A.™ Fungal RNA Miniprep Kit	Omega Bio-Tek (Norcross, USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
HiYield® PCR Clean up and Gel-Extraction Kit	SLG Südlaborbedarf (Gauting)
HMW and LMW Gel Filtration Calibration Kit	GE Healthcare (Freiburg)
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE Healthcare (Freiburg)
Lysozym	Merck (Darmstadt)
pGem®-T easy Vector system	Merck (Darmstadt)
Phusion® HF DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Precision Plus Protein™ All Blue Standard	Bio-Rad (Hercules, USA)
ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (Frankfurt)
Anti FLAG Antibody	Agilent (Santa Clara, USA)
Restriktionsendonukleasen	Jena Bioscience (Jena)
<i>DpnI</i>	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
RNase A	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
T4-DNA-Ligase	Jena Bioscience (Jena)
Wizard clean up	Promega

3.2. Mikroorganismen, Plasmide und Primer

3.2.1. Mikroorganismen

Tabelle 3-5: Verwendete *E. coli* Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	nal ^S str ^S rif ^S thi ⁻ lac ⁻ ara ⁺ gal ⁺ mtl ⁻ F ⁻ recA ⁺ uvr ⁺ lon ⁺	Qiagen (Hilden)
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF ⁻	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Agilent (Santa Clara, USA)
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Tet ^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMRmrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Agilent (Santa Clara, USA)

Tabelle 3-6: Verwendete Pilzstämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
<i>A. terreus</i> FGSC A1156	Wildtyp, sequenziert	FGSC (Kansas City, USA)
<i>A. nidulans</i> TN02A7	<i>pyrG89; pyroA4; nkuA::argB; riboB2</i>	(Nayak et al. 2006)
<i>A. nidulans</i> LO4398	Δ AN7804-7825 (<i>ST Cluster</i>), <i>pyrG89</i> , <i>pyroA4</i> , <i>riboB2</i> , <i>nukA::argB</i> , <i>veA1</i>	(Ahuja et al. 2012)
<i>A. nidulans</i> GR5	<i>pyrG89; wA3; pyroA4; veA1</i>	(Osheroov and May 2000)
<i>C. globosum</i> NRRL 1870	Wildtyp	NRRL (Peoria, USA)
<i>S. cerevisiae</i> BJ5464-NpgA	MAT α <i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1 pep4::HIS3 prb1 Δ1.6R can1 GAL npgA</i>	(Lee et al. 2009)
<i>S. cerevisiae</i> KO1	MAT α <i>ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 HMG1t pep4::TDH3p-npgA-ACT1t-loxP-kanMX-loxP</i>	Kristin Öqvist (nicht veröffentlicht)
<i>S. cerevisiae</i> KO3	MAT α <i>ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 TRP2-1 HMG1t PEP4::TDH3p-NpgA-ACT1t PRB1::loxP</i>	(Hühner et al. 2019)

3.2.2. Plasmide

Tabelle 3-7: Verwendete kommerziell erhältliche Klonierungs- und Expressionsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
pGemT [®] -easy	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang, <i>lacZ</i> , <i>ori</i> , <i>f1 ori</i> , Amp ^R	Promega (Mannheim)
pESC-His	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , GAL1/10-Promotor, Sequenz für C-terminalen FLAG-tag (MCS1) bzw. myc-Tag (MCS2) HIS3, Amp ^R	Agilent (Santa Clara, USA)
pESC-Ura	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> , GAL1/10-Promotor, Sequenz für C-terminalen FLAG-tag (MCS1) bzw. myc-Tag (MCS2) URA3, Amp ^R	Agilent (Santa Clara, USA)
pET28a(+)	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His ₆ -tag C-terminalen His ₆ -tag, Kan ^R	Merck (Darmstadt)
pQE60	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, Sequenz für C-terminalen His ₆ -tag HIS3, Amp ^R	Quiagen (Hilden)
pJW24	Expressionsvektor für <i>A. nidulans</i> , ColE1-Origin, <i>pyrG</i> , pBluescript SK(-)-Derivat, Amp ^R	(Calvo et al. 2004)

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pAF19	Konstrukt zur Überexpression von AbpB (EAU38487) aus <i>A. terreus</i> in Hefe (pESC-HIS; MCS2)	Frehse*
pCaW6	Konstrukt zur Transformation von ATEG_03090 (AtrA _{At}) mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz in <i>A. nidulans</i> , in pJW24	Wunsch 2014
pKO4	Konstrukt zur Transformation von AN6140 (<i>npgA</i>) in <i>S. cerevisiae</i> , in pUG	Öqvist*
pST20	Konstrukt zur Überexpression von EAQ91749 aus <i>C. globosum</i> in <i>E. coli</i> (pHIS8)	Tarcz 2014
pST31	Klonierungskonstrukt für ATEG_08899 (<i>pgnA</i>) aus <i>A. terreus</i> in pGem®-T easy	Tarcz 2014
pST28	Konstrukt zur Transformation von CHGG_03687 (A _{stA}) mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz in <i>A. nidulans</i> , in pJW24	Tarcz 2014
pST38	Konstrukt zur Transformation von ATEG_2004 (A _{pV} A) mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz in <i>A. nidulans</i> , in pJW24	Tarcz 2014
pST33	Konstrukt zur Transformation von ATEG_03563 (M _e A) mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz in <i>A. nidulans</i> , in pJW24	Tarcz 2014
pST37	Konstrukt zur Überexpression von EAU39348 aus <i>A. terreus</i> in <i>E. coli</i> (pHIS8)	Tarcz 2014
pTAKN_2_HICCL2_Sc	Klonierungskonstrukt für die CCL2 aus <i>Humulus lupulus</i> kodonoptimiert für <i>S. cerevisiae</i> in pTAKN_2	Munakata*
pTAKN_2_HICCL4_Sc	Klonierungskonstrukt für die CCL2 aus <i>Humulus lupulus</i> kodonoptimiert für <i>S. cerevisiae</i> in pTAKN_2	Munakata*
pTAKN_2_HIVPS_Sc	Klonierungskonstrukt für die VPS aus <i>Humulus lupulus</i> kodonoptimiert für <i>S. cerevisiae</i> in pTAKN_2	Munakata*

Tabelle 3-9: Im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Konstrukte

Bezeichnung	Beschreibung
pEH1	Transformationskonstrukt für ATEG_08899 mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz, <i>Xba</i> I- <i>Not</i> I Fragment aus pST31, Vektor: pJW24 Expressionsorganismus: <i>A. nidulans</i>
pEH2	Klonierungskonstrukt für pyrG und gpdA Promoter (aus pKM28) Vektor: pGemT®-easy Primer: pyrG fwd & pyrG rvs; pyrG_gpdA & gpdA rvs
pEH3	Klonierungskonstrukt für gpdA Promoter (aus pKM28) mit 40 bp komplementär zu pyrG Vektor: pGemT®-easy

	Primer: pyrG_gpdA & gpdA rvs
pEH4	Klonierungskonstrukt für gpdA Promoter (aus pKM28) mit 40 bp komplementär zu pyrG Vektor: pGemT®-easy Primer: pyrG_gpdA & gpdA rvs
pEH5	Fusionskonstrukt für gpdA Promoter (aus pEH4) und ATEG_02004 (aus pST38) Vektor: pGemT®-easy Primer: pyrG_gpdA & HIS-2004_rvs; 2004 Fus fw & 2004_wA do
pEH6	Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (ApvA) mit C-terminalen His ₆ -Tag, Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165926.1: 330691 bp – 327913 bp) Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: 2004_4_for & 2004_6_HIS_rvs
pEH7	Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (ApvA) mit C-terminalen Flag-Tag, <i>EcoRI-SpeI</i> Fragment aus pEH17 Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH8	Expressionskonstrukt für ATEG_03090 (<i>atrA_{At}</i>), <i>NotI BglII</i> Fragment aus pEH18 Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH9	Expressionskonstrukt für ATEG_03090 (<i>atrA_{At}</i>) mit C-terminalen Flag-Tag, <i>NotI-SpeI</i> Fragment aus pEH18 Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH10	Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (<i>apvA</i>), <i>EcoRI-SpeI</i> Fragment aus pEH16 Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH11	Expressionskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>), <i>EcoRI-BglII</i> Fragment aus pEH20 Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH12	Expressionskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>) mit C-terminalen Flag-Tag, <i>EcoRI-NotI</i> Fragment aus pEH20 Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH13	Expressionskonstrukt für ATEG_03563 (<i>MelA</i>), <i>NotI-SpeI</i> Fragment aus pEH19 Vektor: pGemT®-easy
pEH16	Klonierungskonstrukt für ATEG_02004 (<i>apvA</i>) mit Schnittstellen für <i>EcoRI</i> und <i>SpeI</i> , Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165926.1: 330691 bp – 327913 bp) Vektor: pGemT®-easy Primer: 2004_1_fwd & 2004_2_rvs

pEH17	Klonierungskonstrukt für ATEG_02004 (<i>apvA</i>) ohne Stopkodon, Schnittstellen: <i>EcoRI</i> + <i>SpeI</i> , Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165926.1: 330691 bp – 327913 bp) Vektor: pGemT [®] -easy Primer: 2004_1_fwd & 2004_3_rvs
pEH18	Klonierungskonstrukt für ATEG_03090 (<i>atrA_{At}</i>) ohne Stopkodon, Schnittstellen: <i>NotI</i> + <i>SpeI</i> Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165927.1: 855035 bp – 852276 bp) Vektor: pGemT [®] -easy Primer: 3090_1_fwd & 3090_3_rvs
pEH19	Klonierungskonstrukt für ATEG_03563 (<i>melA</i>) mit Schnittstellen für <i>NotI</i> und <i>SpeI</i> , Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165927.1: 2155631 bp - 215285 bp) Vektor: pGemT [®] -easy Primer: 3563_1_fwd & 3563_2_rvs
pEH20	Klonierungskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>) ohne Stopkodon, Schnittstellen: <i>EcoRI</i> + <i>NotI</i> , Fragment von gDNA amplifiziert (NT_165977.1: 4976571 bp - 4979444 bp) Vektor: pGemT [®] -easy Primer: 3687_1_fwd & 3687_2_rvs
pEH21	Klonierungskonstrukt für ATEG_03563 (<i>melA</i>) ohne Stopkodon; Schnittstellen: <i>NotI</i> + <i>SpeI</i> Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165927.1: 2155631 bp - 215285 bp) Vektor: pGemT [®] -easy Primer: 3563_1_fwd & 3563_3_rvs
pEH22	Expressionskonstrukt für ATEG_03563 (<i>melA</i>) mit C-terminalen Flag-Tag, <i>NotI</i> - <i>SpeI</i> Fragment aus pEH21 Vektor: pGemT [®] -easy
pEH23	Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (<i>apvA</i>) (MCS1) aus und ATEG_01730 (<i>apbB</i>) (MCS2); PCR-Produkt für ATEG_02004 aus pEH25 in pAF19 kloniert Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: KAB-pESC-MSC1rev & KAB-pESC-MCS1for
pEH25	Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (<i>apvA</i>) mit N-terminalen His ₆ -Tag, Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165926.1: 330691 bp – 327913 bp) Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: 2004_5_rvs & 2004_7_His_fwd
pEH26	Expressionskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>) Fragment von gDNA amplifiziert (NT_165977.1: 4976571 bp - 4979444 bp) Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: 3687_3_fwd & 3687_5_rvs

pEH27	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_08899 (<i>pgnA</i>), Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165936.1: 1126983 bp – 1124143 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 8899_4_fwd & 8899_6_rvs</p>
pEH28	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_08899 (<i>pgnA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag, Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165936.1: 1126983 bp – 1124143 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 8899_5_HIS_for & 8899_6_rvs</p>
pEH29	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_02815 (<i>btyA</i>), Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165927.1: 107521bp – 104728 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 2815_1_fwd & 2815_2_rvs</p>
pEH30	<p>Klonierungskonstrukt für HI VPS ohne Stopkodon, Fragment von pTAKN_2_HIVPS_Sc amplifiziert</p> <p>Vektor: pGemT[®]-easy</p> <p>Primer: HIVPS_Bam_for & HIVPS_Kpn/Sal_rvs</p>
pEH31	<p>Expressionskonstrukt für HI VPS mit C-terminalen myc-Tag, <i>Bam</i>HI-<i>Kpn</i>I Fragment aus pEH30</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>
pEH32	<p>Klonierungskonstrukt für HI VPS, Fragment von pTAKN_2_HIVPS_Sc amplifiziert</p> <p>Vektor: pGemT[®]-easy</p> <p>Primer: HIVPS_Bam_for & HIVPS-Stop/Sal_-vs</p>
pEH33	<p>Expressionskonstrukt für HI VPS, <i>Bam</i>HI-<i>Sal</i>I Fragment aus pEH32</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>
pEH34	<p>Expressionskonstrukt für HI VPS mit C-terminalen myc-Tag und HICCL2 <i>Eco</i>RI und <i>Sst</i>I Fragment aus pTAKN_2_HICCL2_Sc in pEH31 kloniert</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>
pEH35	<p>Expressionskonstrukt für HI VPS mit C-terminalen myc-Tag und HICCL4 <i>Eco</i>RI und <i>Sst</i>I Fragment aus pTAKN_2_HICCL4_Sc in pEH31 kloniert</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>
pEH36	<p>Expressionskonstrukt für HI VPS und HICCL2, HICCL2 aus pTAKN_2_HICCL2_Sc <i>Eco</i>RI und <i>Sst</i>I Fragment aus pTAKN_2_HICCL2_Sc in pEH33 kloniert</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>
pEH37	<p>Expressionskonstrukt für HI VPS und HICCL4, <i>Eco</i>RI und <i>Sst</i>I Fragment aus pTAKN_2_HICCL4_Sc in pEH33 kloniert</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>
pEH41	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_02815 (<i>btyA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag, Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165927.1: 107521bp – 104728 bp)</p>

	Vektor: pESC-URA Primer: 2815_3_HIS_fwd & 2815_2_rvs	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH42	Expressionskonstrukt für ATEG_03563 (<i>melA</i>) mit N-terminalen His ₆ -Tag, Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165927.1: 2155631 bp - 215285 bp) Vektor: pESC-URA Primer: 3563_5_HIS_for & 3563_4_rvs	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH43	Expressionskonstrukt für ATEG_03090 (<i>atrA_{At}</i>) mit N-terminalen His ₆ -Tag, Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165927.1: 855035 bp – 852276 bp) Vektor: pESC-URA Primer: 3090_5_HIS_fwd & 3090_3_rvs	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH44	Fusionskonstrukt aus A/T-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH26) & TE-Domänen von ATEG_02004 (aus pEH25) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; pESC-MCS1for & 2004_TE_3687fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH45	Fusionskonstrukt aus A/T-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH26) & TE-Domänen von ATEG_03090 (aus pEH43) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090_TE_3687fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH46	Fusionskonstrukt aus A/T-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH26) & TE-Domänen von ATEG_02815 (aus pEH29) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815_TE_3687fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH47	Fusionskonstrukt aus A/T-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH26) & TE-Domänen von ATEG_08899 (aus pEH27) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899_TE_3687fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH48	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_02004 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH25) & TE-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH26) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3687TE_2004for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH49	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_02004 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH25) & TE-Domäne von ATEG_03090 (aus pEH43) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090TE_2004for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>

pEH50	<p>Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_02004 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH25) & TE-Domäne von ATEG_08899 (aus pEH27)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899TE_2004for</p>
pEH51	<p>Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH28) & TE-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH26)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3687TE_8899for</p>
pEH52	<p>Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH28) & TE-Domäne von ATEG_03090 (aus pEH43)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090TE_8899for</p>
pEH53	<p>Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH28) & TE-Domäne von ATEG_02004 (aus pEH25)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004TE_8899for</p>
pEH54	<p>Expressionskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag Fragment von gDNA amplifiziert (NT_165977.1: 4976571 bp - 4979444 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 3687_4_HIS_fwd & 3687_5_rvs</p>
pEH55	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_03090 (<i>atrA_{At}</i>), Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165927.1: 855035 bp – 852276 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 3090_6_for & 3090_3_rvs</p>
pEH56	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_08899 (<i>pgnA</i>) mit C-terminalen His₆-Tag, Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165936.1: 1126983 bp – 1124143 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 8899_4_for & 8899_7_HIS_rvs</p>
pEH57	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_02815 (<i>btyA</i>) mit C-terminalen His₆-Tag, Fragment von cDNA amplifiziert, (NT_165927.1: 107521bp – 104728 bp)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 2815_1_fwd & 2815_4_HIS_rvs</p>
pEH58	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_02004 mit N-terminalen His₆- Tag (aus pEH25) & T/TE-Domänen von ATEG_03090 (aus pEH43)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090_T_2004fwd</p>

pEH59	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_02004 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH25) & T/TE-Domänen von CHGG_03687 (aus pEH26)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3687_T_2004fwd</p>
pEH60	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_02004 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH25) & T/TE-Domänen von ATEG_08899 (aus pEH27)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899_T_2004fwd</p>
pEH61	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH27) & T/TE-Domänen von ATEG_02004 (aus pEH25)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004_T_8899fwd</p>
pEH62	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH27) & T/TE-Domänen von ATEG_02815 (aus pEH29)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815_T_8899fwd</p>
pEH63	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH27) & T/TE-Domänen von ATEG_03090 (aus pEH43)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090_T_8899fwd</p>
pEH64	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH27) & T/TE-Domänen von CHGG_03687 (aus pEH26)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3687_T_8899fwd</p>
pEH65	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH54) & T/TE-Domänen von ATEG_02004 (aus pEH25)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004_T_3687fwd</p>
pEH66	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH54) & T/TE-Domänen von ATEG_02815 (aus pEH29)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815_T_3687fwd</p>
pEH67	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH54) & T/TE-Domänen von ATEG_03090 (aus pEH43)</p>

	Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090_T_3687fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH68	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & T/TE-Domänen von ATEG_08899 (aus pEH27) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899_T_3687fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH69	Expressionskonstrukt für ATEG_02815 (btyA) nach NCBI, Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165927.1: 107521bp – 104608 bp) Vektor: pESC-URA Primer: 2815_1_fwd & 2815_5_long_rvs	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH70	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & TE-Domäne von ATEG_02004 (aus pEH25) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004TE_3687for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH71	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & TE-Domäne von ATEG_02815 (aus pEH29) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815TE_3687for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH72	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & TE-Domäne von ATEG_03090 (aus pEH43) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090TE_3687for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH73	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & TE-Domäne von ATEG_08899 (aus pEH25) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899TE_3687for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH74	Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (apvA) mit N-terminalen His ₆ -Tag zur Expression in <i>E. coli</i> , von pEH25 Vektor: pQE60 Primer: QE-HIS-tag-f & QE-ESC-MCS1-r	Expressionsorganismus: <i>E. coli</i>
pEH75	Expressionskonstrukt für ATEG_02815 (btyA) mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH41) Vektor: pQE60 Primer: QE-HIS-tag-f & QE-ESC-MCS1-r	Expressionsorganismus: <i>E. coli</i>

pEH76	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_03090 (<i>atrA_{At}</i>) mit N-terminalen His₆-Tag zur Expression in <i>E. coli</i>, von pEH43 amplifiziert, Vektor: pQE60</p> <p>Vektor: pQE60 Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: QE-HIS-tag-f & QE-ESC-MCS1-r</p>
pEH77	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_03563 (<i>mela</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH42)</p> <p>Vektor: pQE60 Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: QE-HIS-tag-f & QE-ESC-MCS1-r</p>
pEH78	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_08899 (<i>pgnA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH29)</p> <p>Vektor: pQE60 Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: QE-HIS-tag-f & QE-ESC-MCS1-r</p>
pEH79	<p>Expressionskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH54)</p> <p>Vektor: pQE60 Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: QE-HIS-tag-f & QE-ESC-MCS1-r</p>
pEH80	<p>Expressionskonstrukt für AN6140 (<i>npgA</i>) (aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4; BN001301.1: 1109260 bp - 1110291 bp) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pKO4)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: His_NpgA_fwd & NpgA_rvs</p>
pEH81	<p>Expressionskonstrukt für AN6140 (<i>npgA</i>) (aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4; BN001301.1: 1109260 bp - 1110291 bp) mit C-terminalen His₆-Tag (aus pKO4)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: NpgA_fwd & NpgA-HIS_rvs</p>
pEH82	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_00702 (EAU39348), Fragment von pST35 amplifiziert (NT_165972.1: 1975238 bp – 1974574 bp; 1974509 bp – 1974036 bp; 1973965 bp – 1973830 bp)</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 0702_1_fwd & 0702_2_rvs</p>
pEH83	<p>Klonierungskonstrukt für ATEG_02823 (EAU36097), Fragment von pEH88 amplifiziert (NT_165972.1: 121853 bp - 121991 bp; 122052 bp – 123178 bp)</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 2823_1_fwd & 2823_2_rvs; CaW_02823-3 & CaW_02823-2</p>
pEH84	<p>Klonierungskonstrukt für ATEG_03092 (EAU36366), Fragment von pEH89 amplifiziert (NT_165927.1: 857335 bp – 858936 bp; 858988 bp - 859448 bp)</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: 3092_1_fwd & 3092_2_rvs; ATEG1.1 & ATEG1.2</p>
pEH85	<p>Klonierungskonstrukt für ATEG_06111 (EAU33872), Fragment von gDNA amplifiziert</p> <p>Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p>

	Primer: 6111_3_fwd & 6111_2_rvs; CaW_6111-3 & CaW_6111-2
pEH86	Klonierungskonstrukt für CHGG_03684 (EAQ 91749), Fragment aus pST21 amplifiziert (NT_165977.1: 4969501 bp – 4968819 bp; 4968662 bp – 4968276 bp 4968224 bp – 4968089 bp) Vektor: pESC-HIS Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: 3684_1_fwd & 3684_2_rvs
pEH87	Klonierungskonstrukt für ATEG_00702 (EAU39348), Fragment aus gDNA von <i>A. terreus</i> FGSC A1156 amplifiziert (NT_165972.1: 1975377 bp – 1973662 bp) Vektor: pGemT®-easy Primer: 0702_gDNA_fwd & 0702_gDNA_rvs
pEH88	Klonierungskonstrukt für ATEG_02823 (EAU36097), Fragment aus gDNA von <i>A. terreus</i> FGSC A1156 amplifiziert (NT_165927.1: 121723 bp - 123300 bp) Vektor: pGemT®-easy Primer: 2823_gDNA_fwd & 2823_gDNA_rvs
pEH89	Klonierungskonstrukt für ATEG_03092 (EAU36366), Fragment aus gDNA von <i>A. terreus</i> FGSC A1156 amplifiziert (NT_165927.1: 857335 bp – 859448 bp) Vektor: pGemT®-easy Primer: 3092_gDNA_fwd & 3092_gDNA_rvs
pEH90	Klonierungskonstrukt für ATEG_06111 (EAU33872), Fragment aus gDNA von <i>A. terreus</i> FGSC A1156 amplifiziert (NT_165931.1: 1343720 bp - 1345498 bp) Vektor: pGemT®-easy Primer: 6111_gDNA_fwd & 6111_gDNA_rvs
pEH91	Expressionskonstrukt für ATEG_00700 (<i>atqA</i>) mit N-terminalen His ₆ -Tag, Fragment von cDNA amplifiziert (NT_165972.1: 1968773 bp – 1971661 bp) Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: 0700_3_fwd & 0700_2_rvs
pEH92	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_02815 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH41) & T/TE-Domänen von ATEG_08899 (aus pEH27) Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2815-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899_T_2815fwd
pEH93	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_00700 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH91) & T/TE-Domänen von ATEG_08899 (aus pEH27) Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i> Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899_T_0700fwd
pEH94	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_03090 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH43) & T/TE-Domänen von ATEG_08899 (aus pEH27)

	Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3090-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899_T_3090fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH97	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_00700 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH91) & T/TE-Domänen von ATEG_02815 (aus pEH41) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815_T_0700fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH98	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_03090 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH43) & T/TE-Domänen von ATEG_02815 (aus pEH41) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3090-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815_T_3090fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH100	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_2004 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH25) & T/TE-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH54) GS Überhang* Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3687T_GS-oh_fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH101	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_2004 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH25) & T/TE-Domäne von ATEG_08899 (aus pEH28) GS Überhang* Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899T_GS-oh_fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH102	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & T/TE-Domäne von ATEG_02004 (aus pEH25) GS Überhang* Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004T_GS-oh_fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH103	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & T/TE-Domäne von ATEG_03090 (aus pEH43) GS Überhang* Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090T_GS-oh_fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH104	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von CHGG_03687 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH54) & T/TE-Domäne von ATEG_08899 (aus pEH28) GS Überhang* Vektor: pESC-URA	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>

	Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 3687AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899T_GS-oh_fwd
pEH105	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH28) & T/TE-Domäne von ATEG_02004 (aus pEH25) GS Überhang*</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004T_GS-oh_fwd</p>
pEH106	<p>Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_08899 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH28) & T/TE-Domäne von CHGG_03687 (aus pEH54); GS Überhang*</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899AGS-oh_rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3687T_GS-oh_fwd</p>
pEH107	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_02004 (<i>apvA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH25)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: pET28_His-tag_f & HIS8-ESC-MCS1-r</p>
pEH108	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_02815 (<i>btyA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH41)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: pET28_His-tag_f & HIS8-ESC-MCS1-r</p>
pEH109	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_03563 (<i>melA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH42)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: pET28_His-tag_f & HIS8-ESC-MCS1-r</p>
pEH110	<p>Expressionskonstrukt für ATEG_08899 (<i>pgnA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH29)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: pET28_His-tag_f & HIS8-ESC-MCS1-r</p>
pEH111	<p>Expressionskonstrukt für CHGG_03687 (<i>astA</i>) mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH54)</p> <p>Vektor: pET28a-(+) Expressionsorganismus: <i>E. coli</i></p> <p>Primer: pET28_His-tag_f & HIS8-ESC-MCS1-r</p>
pEH112	<p>Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_00700 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH91) & TE-Domäne von ATEG_02004 (aus pEH25)</p> <p>Vektor: pESC-URA Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i></p> <p>Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004TE_0700for</p>
pEH113	<p>Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_00700 mit N-terminalen His₆-Tag (aus pEH91) & TE-Domäne von ATEG_02815 (aus pEH41)</p>

	Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815TE_0700for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH114	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_00700 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH91) & TE-Domäne von ATEG_03090 (aus pEH43) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090TE_0700for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH115	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_00700 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH91) & TE-Domäne von ATEG_08899 (aus pEH28) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 8899TE_0700for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH116	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_00700 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH91) & T/TE-Domänen von ATEG_02004 (aus pEH25) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2004T_0700for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH117	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_00700 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH91) & T/TE-Domänen von ATEG_03090 (aus pEH43) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 0700-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 3090T_0700for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH118	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_02004 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH25) & TE-Domäne von ATEG_02815 (aus pEH41) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815TE_2004for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH119	Fusionskonstrukt aus A-Domäne von ATEG_02004 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH25) & T/TE-Domänen von ATEG_02815 (aus pEH41) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 2004-A-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815_T_2004fwd	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>
pEH120	Fusionskonstrukt aus A/T-Domänen von ATEG_08899 mit N-terminalen His ₆ -Tag (aus pEH28) & TE-Domäne von ATEG_02815 (aus pEH41) Vektor: pESC-URA Primer: KAB-pESC-MCS1rev & 8899-T-rvs; KAB-pESC-MCS1for & 2815TE_8899for	Expressionsorganismus: <i>S. cerevisiae</i>

* Ein Überhang aus einem GSGSGSGS-Motiv zwischen der A- und T-Domäne der Rekombinierten NRPS-ähnlichen Gene

3.2.3. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins Genomicx (Ebersberg) und Microsynth (Balgach, Schweiz) synthetisiert.

Tabelle 3-10: Im Rahmen dieser Arbeit für die Expression der NRPS-ähnlichen Gene in *A. nidulans* designte und verwendete Oligonukleotide. Überhänge sind klein geschrieben, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, der *His-Tag* ist kursiv.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
gpdA fwd	tcagacacagaataactctccatgcgagagacggacggt
gpdA rvs	ATGGTGGTGGTGATGATGCATgattaaaggttcttggat
PyrG fwd	tctagaattctgtctgagaggaggcact
PyrG rvs	accgtccgtctctccgcatggagagttattctgtgtct
pyrG_gpdA	gcttggcatcacgcatcagtgcctcctctcagacagaatCATGCGGAGAG ACGGACGGACG
wAup_pyrG_rvs	ACATATTTTCGTCAGACACAGAATAACTCTCGATCAGGAGAAGGAGAGTC
pyrG_wA_fwd	TCAGCGGACTTGACTCTCCTTCTCCTGATCGAGAGTTATTCTGTGTCTG
pyrG_gpdA_rvs	TCTGCGTCCGTCCGTCTCTCCGCATGattctgtctgagaggaggcactg
03687 Fus fwd	ATGcatcatcaccaccatGGCTCCCTCGCGGTTTTAG
08899 Fus fwd	ATGcatcatcaccaccataATAAGAAGCTCAAGCTTTTC
03563 Fus fwd	ATGcatcatcaccaccatCAACCAAGCCTTATTCCCTC
03090 Fus fwd	ATGcatcatcaccaccatTCTTTCAAGAACCTCCAACA
02004 Fus fwd	ATGcatcatcaccaccatATGACTTTGAACAACCTACA
3687_wA do	cctttttcgccctttgtcatagtaaagtgattcgcggtcatgGCACCCAATC ACTGTCAACTAC
2004_wA do	cctttttcgccctttgtcatagtaaagtgattcgcggtcatgAAAGATTTAC TTAACGCGAGTCTCACAATC
8899_wA do	gcctttttcgccctttgtcatagtaaagtgattcgcggtcatgTTTTGGCAG GTGCCTTTTGATAG
3563_wA do	cctttttcgccctttgtcatagtaaagtgattcgcggtcatgTCTACCTCAT CTCTGAGAGCTGTC
3090_wA do	gcctttttcgccctttgtcatagtaaagtgattcgcggtcatgAGGTCGTCT GGGGACGTGAGG
His-3687_rvs	CTGAAACCGCGAGGGAGCCatggtggtggtgatgatg
His-08899_rvs	GCTTGAGCTTCTTATTatggtggtggtgatgatg
His-03563_rvs	GAGGGAATAAGGCTTGTTGatggtggtggtgatgatg
His-2004_rvs	CCTGTAGGTTGTTCAAAGTatggtggtggtgatgatg

Tabelle 3-11: Oligonukleotide, die für die Klonierung der NRPS-ähnlichen Gene in den pESC-URA Vektor verwendet wurden. Überhänge sind klein geschrieben, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, der *His-Tag* ist kursiv.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
2004_1_fwd	<u>ggaattcc</u> ATGACTTTGAACAACCTACAG
2004_2_rvs	<u>gactagtc</u> TCACATTCCTCGCTCATCCAG
2004_3_rvs	<u>gactagtc</u> GGCACATTCCTCGCTCATCCAG
2004_4_for	aaaagtaagaattttttgaaaATGACTTTGAACAACCTACAG
2004_5_rvs	atcgctcgatccttgtaatcCATTCTCGCTCATCCAGC
2004_6_His_rvs	atcgctcgatccttgtaatcTCAatggtgatggtgatggtgCATTCTCGCTCATCCAGC
2004_7_His_fwd	tccaaaaaaaaagtaagaattttttgaaaATGcaccatcaccatcaccatAC TTTGAACAACCTACAG
2815_1_fwd	tttga aaattcgaattcATGACCAAATTGATTTGATTAAC
2815_2_rvs	aatccatcgatactagtCTACAAACCCCGAGCATCCATC
2815_3_HIS_fwd	gaatttttgaaaattcgaattcATGcaccatcaccatcaccatACCAAAT TGATTTGATTAAC
2815_4_HIS_rvs	tccttgtaatccatcgataCTAgtggtgatggtgatggtgCAAACCCCGAG CATCCATC
2815_5_long_rvs	TTGTTAATTAAGAGCTCAGAGAGATAGAGAGAGACAGAGAGTACCCCGAGC ATCCATCGC
3090_1_fwd	ataagaatgcggccgctaaATGTCTTTCAAGAACCTCCAAC
3090_2_rvs	gaagatcctcactagtcTAGTCGACGGCCATACTCTG
3090_3_rvs	<u>agatctaaactagtc</u> CAATCCCCGTGCTTCCAAC
3090_4_Stop_rvs	gagctcagatcctatcgctcgatcctCTAAATCCCCGTGCTTCCAAC
3090_5_HIS_for	ccctcactaaagggcgccgctaaATGcaccatcaccatcaccatTCTTTC AAGAACCTCCAAC
3090_6_for	tccaaaaaaaaagtaagaattttttgaaaATGTCTTTCAAGAACCTCCAAC
3563_1_fwd	ataagaatgcggccgcATGCAACCAAGCCTTATTCC
3563_2_rvs	<u>gactagt</u> TTACATGCCCCCTCTCAGCAAG
3563_3_rvs	<u>gactagt</u> TTACATGCCCCCTCTCAGCAAG
3563_4_rvs	gtcatccttgtaatccatcgatactagtttacATGCCCCCTCTCAGCAAG
3563_5_HIS_fwd	gaattcaaccctcactaaagggcgccgcATGcaccatcaccatcaccatC AACCAAGCCTTATTCC
8899-1-fwd	ataagaatgcggccgctaaactATGAATAAGAAGCTCAAGC
8899_2_rvs	ggactagtTTAGATTCCACGGTCATTACAGCG
8899_3_rvs	ggactagtTTGATTCCACGGTCATTACAGCG
8899_4_for	tccaaaaaaaaagtaagaattttttgaaaATGAATAAGAAGCTCAAGC
8899_5_HIS_for	tccaaaaaaaaagtaagaattttttgaaaATGcaccatcaccatcaccatAA TAAGAAGCTCAAGC
8899_6_rvs	atcgctcgatccttgtaatcTTAGATTCCACGGTCATTACAGCG
8899_7_HIS_rvs	atcgctcgatccttgtaatcTTAatggtgatggtgatggtgGATTCCACG GTCATTACAGCG
0700_1_fwd	tttga aaattcgaattcATGACTCGCACGGAGATCCTC
0700_2_rvs	aagagctcagatcctatCTACACCCCTCGCTCCCTCAAC

0700_3_HIS_fwd	gaatttttgaaaattcgaattcATGcaccatcaccatcaccatACTCGCAC GGAGATCCTC
3687_1_fwd	cggaaattccgATGGGCTCCCTCGCGGTTTC
3687_2_rvs	agatctgggcgccgcCAGCCCACGCTCCCGCAGC
3687_3_fwd	agtaagaatttttgaaaattcgaattccgATGGGCTCCCTCGCGGTTTC
3687_4_HIS_fwd	agtaagaatttttgaaaattcgaattccgATGcaccatcaccatcaccatG GCTCCCTCGCGGTTTC
3687_5_rvs	tcataccttgtaatccatcgatactagtCTACAGCCCACGCTCCCGCAGC

Tabelle 3-12: Für die Expression der NRPS-ähnlichen Gene in *E. coli* verwendeten Oligonukleotide. Die homologen Bereiche sind klein geschrieben.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
pET28_His-tag_f	gtttaactttaagaaggagatataccatggATGCACCATCACCATCACC
HIS8_ESC_MCS1_r	ttgttagcagccgatctcagtggaccGTTAATTAAGAGCTCAGATCT
QE-HIS-tag-f	aattcattaaagaggagaaattaaccatggATGCACCATCACCATCACC
QE-ESC-MCS1-r	aacaggagtccaagctcagctaattaagCTTAATTAAGAGCTCAGATCT
His_NpgA_fwd	atgaaacaccaccaccaccaccaccacGTGCAAGACACATCAAG
NpgA_rvs	aactcagcttccttttcgggctttgTTAGGATAGGCAATTACACAC
NpgA_fwd	tgtttaactttaagaaggagatatataATGGTGCAAGACACATCAAG
NpgA-HIS_rvs	cggatctcagtggtggtggtggtggtgGGATAGGCAATTACACAC

Tabelle 3-13: Oligonukleotide, die für die Reorganisation der Domänen von NRPS-ähnlichen Genen verwendet wurden. Die homologen Bereiche sind klein geschrieben.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
2004_A_rvs	GTTATTGGCGTTCTGCTAGGT
2815_T_2004fwd	ggagtatgcgacctaccagaacgccaatACAATCGATTGCTCAAGCTC
3090_T_2004fwd	ggagtatgcgacctaccagaacgccaatAACAGCCATCTAGTGAAGATG
8899_T_2004fwd	gagtatgcgacctaccagaacgccaatAACGAACAGATGATGGCTCTAC
3687_T_2004fwd	gggagtatgcgacctaccagaacgccaatAACGACGCCGCCGTCAAGAG
2004T_rvs	GTACTCGCGCGGGCCCTGCAG
2815TE_2004for	tttgaaaaactgcagggcccgcgcgagTACAACCCCGTCGTGACCCTG
3090TE_2004for	tttgaaaaactgcagggcccgcgcgagTACAACCCGGTCATCACCTTG
8899TE_2004for	tggaaaaactgcagggcccgcgcgagTACAACCCCTGTAGTCGTATTAC
3687TE_2004for	tttgaaaaactgcagggcccgcgcgagTACGACCCCGTGGTCACGCTG
8899_A_rvs	GTTTCGCTTCTTGATAACTTTTATAG
2004_T_8899fwd	gggagactataaaagttatcaagaagcgAACGAGCTGATGCGACGATAC
2815_T_8899fwd	gggagactataaaagttatcaagaagcgACAATCGATTGCTCAAGCTC
3090_T_8899fwd	gggagactataaaagttatcaagaagcgaacagccatctagtgaagatg
3687_T_8899fwd	aaggggagactataaaagttatcaagaagcgAACGACGCCGCCGTCAAG

8899T_rvs	GTATATGCTGCAGTCTCTTTGC
2004TE_8899for	cacgctcagcaaagagactgcagcataTACGATCCGGTGGTGACGCTC
2815TE_8899for	cacgctcagcaaagagactgcagcataTACAACCCCGTCGTGACCCTG
3090TE_8899for	cacgctcagcaaagagactgcagcataTACAAACCGGTCATCACCTTG
3687TE_8899for	cacgctcagcaaagagactgcagcataTACGACCCCGTGGTCACGCTG
3687_A_rvs	GTTGGCCTCCTGCTGGGC
2004_T_3687fwd	cggcgccttcaaggcccagcaggaggccAACGAGCTGATGCGACGATAC
2815_T_3687fwd	cggcgccttcaaggcccagcaggaggccACAATCGATTGCTCAAGCTC
3090_T_3687fwd	cggcgccttcaaggcccagcaggaggccAACAGCCATCTAGTGAAGATG
8899_T_3687fwd	ggcgccttcaaggcccagcaggaggccAACGAACAGATGATGGCTCTAC
3687T_rvs	GTA TCGTGCGGCTTCTTGTC
2004TE_3687for	cgtcgagacggacaagaagccgcacgagTACGATCCGGTGGTGACGCTC
2815TE_3687for	cgtcgagacggacaagaagccgcacgagTACAACCCCGTCGTGACCCTG
3090TE_3687for	cgtcgagacggacaagaagccgcacgagTACAAACCGGTCATCACCTTG
8899TE_3687for	gtcgagacggacaagaagccgcacgagTACAACCTGTAGTCGTATTAC
0700_A_rvs	GTTAGCCGCTTCGTAGGCTGC
2004_T_0700fwd	ggccagtttgcagcctacgaagcggctAACGAGCTGATGCGACGATAC
2815_T_0700fwd	ggccagtttgcagcctacgaagcggctACAATCGATTGCTCAAGCTC
3090_T_0700fwd	ggccagtttgcagcctacgaagcggctAACAGCCATCTAGTGAAGATG
8899_T_0700fwd	ggccagtttgcagcctacgaagcggctAACGAACAGATGATGGCTCTAC
0700T_rvs	ATACACATGCTTCCGTCCCGTG
2004TE_0700for	accagcggcacgggacggaagcatgtgTACGATCCGGTGGTGACGCTC
2815TE_0700for	accagcggcacgggacggaagcatgtgTACAACCCCGTCGTGACCCTG
3090TE_0700for	accagcggcacgggacggaagcatgtgTACAAACCGGTCATCACCTTG
8899TE_0700for	accagcggcacgggacggaagcatgtgTACAACCTGTAGTCGTATTAC
3090_A_rvs	GTTTGTGTCCTGGTAGGCTTTG
2815_T_3090fwd	GGCGAGTACAAAGCCTACCAGGACACAAACAATCGATTGCTCAAGCTC
8899_T_3090fwd	GGCGAGTACAAAGCCTACCAGGACACAAACGAACAGATGATGGCTCTAC
2815_A_rvs	GTTTGTCTCCTCGAATGCCTG
8899_T_2815fwd	GGCGCCTTCCAGGCATTCGAGGAGACAAACGAACAGATGATGGCTCTAC
8899T_GS-oh_fwd	ggtggtagtggtagtggtggtagtggtagtAACGAACAGATGATGGCTC
2004T_GS-oh_fwd	ggtggttrgtggtagtggtaggttrgtggtagtAACGAGCTGATGCGACG
3090T_GS-oh_fwd	ggtagtggtagtggtggtagtggtagtAACAGCCATCTAGTGAAGATG
3687T_GS-oh_fwd	ggtagtggtagtggtggtagtggtagtAACGACGCCGCCGTCAAGAG
2004A_GS-oh_rvs	actaccactaccaccactaccactaccATTGGCGTTCTGGTAGGTCTG
8899A_GS-oh_rvs	actaccacyaccaccCGCTTCTTGATAACTTTTATAG
3687A_GS-oh_rvs	actaccactaccaccactaccactaccGGCCTCCTGCTGGGCCTTG

Tabelle 3-14 Oligonukleotide, die für die Klonierung der putativen Prenyltransferasen verwendet wurden. Überhänge sind klein geschrieben.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
0702_gDNA_fwd	GAACTATATCGAATtCCTCTCC
0702_gDNA_rvs	CGGTAGTTATCGAATtCCGTATG
0702_1_fwd	cgactcactatagggcccggcggtcgacATGACCATCCACGCCAAACAC
0702_2_rvs	gagcggatcttagcttagccgcggtaccCTAGACGTAGTCTCCCAAAGC
2823_gDNA_fwd	TAAAAGAATTcAACCACACAGC
2823_gDNA_rvs	TAACTAACTGAgAATTCCACG
2823_1_fwd	tcaaggagaaaaaaccccggatccgtaATGACGATTCATGATCCGAATG
2823_2_rvs	ggatcttagcttagccgcggtaccaagctTATACTGGCCGGGCGCCTTCC
CaW_02823-2	tctgcgctcgcagatgtcttCGCTGGTGTGGACATGTCCATTTCTACTCG
CaW_02823-3	cgagtagaaatggacatgtccacaccagcgAAGACATCTGCGAGCGCAGA
3092_gDNA_rvs	GGATTGGATTGGaATTCCTTG
3092_gDNA_fwd	TAGCAAGAGAATTcTACTTGGG
3092_1_fwd	cgactcactatagggcccggcggtcgacATGGGCTCAACAGACAAGACC
3092_2_rvs	gatcttagcttagccgcggtaccaagctTACAGGAGATCAGCTACCCGTC
3092-kurz_fwd	cttatcgtcgtcatccttgtaatcCTAGTAAGAAGATACGTCCTCCTTG
ATEG1.1	cgactcgtcaaggttacaagaggggTAGTAAGAAGATACGTCCTCCTTG
ATEG1.2	caaggaggacgtatcttcttactaCCCCTCTTGTAACCTTGACGAGTCGT
3684_1_fwd	tcaaggagaaaaaaccccggatccgtaATGGCGACCGTTGACACCATCG
3684_2_rvs	ggatcttagcttagccgcggtaccaagctTAAGTATACTTCCAGTTACCC
3684_fus_4_fwd	agctcgggccccggcctcgatgtcgttgcgCTCGACTGTCTTGACCCGAC
6111_3_fwd	cccggatccgtaatacgactcactataggATGTCCTTGCCATACCTTCC
06111_TEST_fwd	GCACCTCCATGGCCTCCTTGC
6111_gDNA_rvs	CAGTAGGCATTTGGAATTCATC

Tabelle 3-15: Oligonukleotide, die für Sequenzierung verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
0700_K_fwd	ACCTTTGCACCCAAC TTC
2004_K_fwd	GATGACGCACAGCACCGTCAG
2815_K_fwd	GAAAGAGAACCATCACCT
3090_Seq_fwd	GAATGTCATAGTGCCTGGGTTTG
3563_K_fwd	GCTATTGCTATGGGTCGATGTTG
3687_K_fwd	CAAGACGCTCGACGAGGTGTTC
8899_K_fwd	ATCTTCCACCTAGTCTGAATG
pESC-MCS1-f1	CTGAAAGTTCCAAAGAGAAG
pESC-MCS1-r1	TTTCTGGCAAGGTAGACAAG
pESC-MCS2-f3	GCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCG
pESC-MCS2-r3	GTCCCAAACCTTCTCAAGCAAGG
pESC-MCS2-f1	CAAATGTAATAAAAGTATCAAC
pESC-MCS2-r1	GGTGTCTAACTCCTTCC
00700_Seq_fwd	GCGTCTCGCGCACCTTTGC
KAB-pESC-MCS1for	CCGACAACCTTGATTGGAGACTTGAC
KAB-pESC-MCS1rev	GGTGGTAATGCCATGTAATATG

3.2.4. Mikroorganismen

3.3. Nährmedien und Lösungen

3.3.1. Nährmedien

Die angegebenen Mengen beziehen sich in der Regel auf ein Endvolumen von 1 l. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien und Zusätze zur Sterilisierung autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurden dem Flüssigmedium 1,5% (m/v) Agar zugesetzt. Hitzelabile Zusätze, wie beispielsweise Antibiotika wurden mit einem Spritzenfilter (Filtropur S 0,2, Porengröße 0,2 µm, Sarstedt, Nümbrecht) steril filtriert und nach der Sterilisation zugegeben.

Glukose- und Galaktoselösungen in kleinen Mengen (unter 50 ml) wurden ebenfalls über einen Spritzenfilter (Filtropur S 0,2) filtriert. Größer Mengen für die Zugabe zu Hefemedien von 20%igen Glucoselösungen wurden autoklaviert. Galaktoselösungen wurden über eine Millipore Express™ PLUS Membranfiltereinheit mit (Filterporengröße 0,22µm, Merck Millipore, Darmstadt), die an eine Membranpumpe angeschlossen wurde filtriert.

3.3.1.1. Nährmedien für die Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

SOC-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
MgCl ₂	0,952 g
MgSO ₄	2,408 g

Die Bestandteile wurden in Wasser gelöst, auf 980 ml aufgefüllt und durch autoklavieren sterilisiert. Im Anschluss wurden 20 ml 1 M Glukoselösung hinzugefügt.

TB-Medium

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glycerin (99,5%)	4,0 ml

Die Bestandteile wurden in Wasser gelöst, auf 900 ml aufgefüllt, und durch autoklavieren sterilisiert. Im Anschluss wurden 100 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) zugegeben.

Kaliumphosphatpuffer

KH_2PO_4	0,17 M
K_2HPO_4	0,72 M

3.3.1.2. Nährmedien für die Kultivierung von Ascomyceten**Glukose Minimal Medium (GMM)**

Nitratsalze 20x	50 ml
Spurenelemente	1 ml
Glucose	10 g

Mit NaOH auf pH6,5 einstellen

Die Spurenelemente wurden steril nach dem Autoklavieren zugeben

HME

Malzextrakt	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,4% (w/v)
Glucose	0,4% (w/v)

CDH

Czapek-Dox	3,5% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)

3.3.1.3. Medien zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefemedien wurden vorläufig auf ein Volumen von 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach der Sterilisierung wurden sterile 20%ige Zuckerlösungen als Kohlenstoffquelle zugefügt. Dabei wurde Galaktose für die Expression von Proteinen in Flüssigmedien verwendet, ansonsten wurde Glukose eingesetzt.

YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

Hefeextrakt	1% (w/v)
Peptone	2% (w/v)
Glucose	2% (w/v)

SC-Medium (Synthetic Complete)

Yeast Nitrogen Base without aminoacids	6,7% (w/v)
CMS-HIS-LEU-URA	0,069%
Zucker	2%
L-Leucin	60mg
L-Hisitidin	20mg
L-Uracil	20mg

Zur Selektion wurden die auf den Plasmiden kodierten Aminosäuren ausgespart.

Mit 1M NaOH pH-Wert auf 6,2-6,3 einstellen

3.3.2. Antibiotika und Auxotropiemarker

Die Antibiotika wurden in Wasser als Stammlösung angesetzt, zur Sterilisierung über einem Spritzenfilter (Filtropur S 0,2) filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte unter sterilen Bedingungen kurz vor Gebrauch der Medien. Festmedien wurden vor der Zugabe auf etwa 50°C abgekühlt.

Tabelle 3-16: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration im Medium [$\mu\text{g/ml}$]	Lösungsmittel des Antibiotikums
Carbenicillin	50	50	H ₂ O
Kanamycin	50	25	H ₂ O
Tetrazyklin	12,5	12,5	H ₂ O

Tabelle 3-17: Verwendete Auxotrophiemarker

Auxotrophiemarker	Endkonzentration im Medium [g/l]
L-Arginin	0,5
Pyridoxin Hydrochlorid	0,5
Riboflavin	0,0025
Uracil	1,0
Uridin	2,4

3.3.3. Lösungen und Puffer

Tabelle 3-18: Puffer und Lösungen für die Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans*

Puffer/ Lösungen	Bestandteile	Konzentration/Volumen
Tween-Lösung	Tween® 80	0,1%
Lösung A für das Osmotische Medium	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,2 M
Lösung B für das Osmotische Medium	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	0,2 M
Lösung C für das Osmotische Medium	Lösung A	7 ml
	Lösung B	93 ml
Osmotisches Medium	Mg ₂ SO ₄ * 7H ₂ O	1,2 M
	Lösung C	5 ml
	Mit HCl pH auf 5,7 einstellen und sterilfiltrieren	
Trapping-Puffer	Sorbitol	600 mM
	Tris-Base	100 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern	
STC-Puffer	Sorbitol	1,2 M
	CaCl ₂	10 mM
	Tris-Base	10 mM
	pH 7,5 mit HCl einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern	
CaCl ₂ – Lösung	CaCl ₂	1 M
PEG-Lösung	PEG 3350	60% (v/v)
Calcium – PEG	1 M CaCl ₂	150 µl
	PEG-Lösung	2,85 ml
Nitratsalze (20x)	NaNO ₃	120 g
	KCl	10,4 g
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	10,4 g
	KH ₂ PO ₄	30,4 g
	Wasser	Ad 1000 ml
Spurenelemente	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,2 g
	H ₃ BO ₃	1,1 g
	MnCl ₂ * H ₂ O	0,5 g
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
	CoCl ₂ * 5 H ₂ O	0,16 g

	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,16 g
	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,11 g
	EDTA	5,0 g
	Bis zum Farbumschlag rühren, Sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern	
Bottom Medium	Nitratsalze (20x)	50 ml
	Spurenelemente	1 ml
	Glucose	10,0 g
	Sorbitol	219,0 g
	Agar	15,0 g
	Wasser	Ad 1000 ml
	pH 6,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, Spurenelemente steril nach dem Autoklavieren zugeben	
Top Agar	Nitratsalze (20x)	25 ml
	Spurenelemente	0,5 ml
	Glucose	5,0 g
	Sorbitol	110,0 g
	Agar	3,75 g
	Wasser	Ad 500 ml
	pH 6,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, Spurenelemente steril nach dem Autoklavieren zugeben	

3.3.3.1. Lösungen zur Extraktion von DNA

Tabelle 3-19: Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Miniprep-Lösung I Resuspensionspuffer	Tris-Base	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNaseA	100 µg/ml
	pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren, RNase frisch zugeben	
Miniprep Lösung II	NaOH	0,2 M
Lysepuffer	SDS	1 % (w/v)
Miniprep Lösung III	Kaliumacetat	3 M
Neutralisierungspuffer	pH 4,9-5,5 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren	

Tabelle 3-20: Puffer zur Isolierung von DNA aus Ascomyceten

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Digestion Buffer (DB)	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	NaCl	400 mM
	EDTA	25 mM
	SDS 10 %	0,5 %
	pH auf 8,0 einstellen, autoklavieren	

3.3.3.2. Puffer zur Detektion von DNA

Tabelle 3-21: Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Puffer	Bestandteile	Konzentration
50x TAE	Tris-Base	2 M
	Essigsäure 96%	400 mM
	EDTA	50 mM
	pH auf 8,0 einstellen, autoklavieren	
6x Probenpuffer	Glycerin	30% (v/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)

3.3.3.3. Puffer zur Arbeiten mit *S. cerevisiae*Tabelle 3-22: Puffer für die Transformation von *S. cerevisiae*

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Puffer A	Sorbitol	1 M
	Bicin (pH 8,35)	10 mM
	Ethylenglykol	3% (v/v)
	autoklavieren, bei Raumtemperatur aufbewahren	
Puffer B	PEG 1000	40% (w/v)
	Bicin (pH8,35)	200 mM
	autoklavieren, bei Raumtemperatur aufbewahren	

Tabelle 3-23: Puffer zur Isolierung von Proteinen aus Hefe

Puffer	Bestandteile	Konzentration
GBD (<i>glass beads disruption</i>)	Tris-Base	20 mM
	Magnesiumchlorid Hexahydrat	10 mM
	EDTA	50 mM
	Glycerol 100%	5% (v/v)
	pH 7,9 mit HCl einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4°C	

3.3.3.4. Lösungen und Puffer zur Isolierung und Analyse von Proteinen

Tabelle 3-24: Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel Affinitätschromatographie

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren; Lagerung: 4°C	
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren; Lagerung: 4°C	
Eluationspuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren; Lagerung: 4°C	
Proteinlagerungspuffer	Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	Auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren; Lagerung: 4°C	

Tabelle 3-25: Puffer und Lösungen zur SDS-PAGE und Comassie-Färbung

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration/Volumen
Trenngel 12%	Wasser	6,8 ml
	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	5,0 ml
	10% (w/v) SDS	200 µl
	Rotiphorese Gel 30	8,0 ml
	10% (w/v) APS	300 µl
	TEMED	10 µl
	4 Gele: (8 cm x 5,8 cm x 0,75 cm)	
Sammelgel 4%	Wasser	3,05 ml
	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,25 ml
	10% (w/v) SDS	50 µl
	Rotiphorese Gel 30	650 µl
	10% (w/v) APS	100 µl
	TEMED	5 µl
	4 Gele: (8 cm x 5,8 cm x 0,75 cm)	
10 x SDS-Puffer	Tris-Base	250 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	1% (w/v)
5 x Protein-Probenpuffer	Tris/HCl (pH 6,8)	250 mM
	DTT	500 mM
	SDS	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)

Färbelösung Coomassie	CoomassieBrilliant Blau G-250	1 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	50 % (v/v)
Entfärberlösung	Ethanol	20 % (v/v)
Coomassie	Essigsäure	10 % (v/v)

Tabelle 3-26: Puffer und Lösungen für den Western Blot

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration/Volumen
Roedel Mix	NaOH	250 mM
	β-Mercaptoethanol	140 mM
	PMFS	3 mM
Frisch vor Gebrauch eine Tablette Protease Inhibitor (pro 10 ml) zugeben und lösen		
Towbin	Tris-HCl (pH 8,8)	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
TBS	Tris-HCl (pH7,4)	10 mM
	NaCl	0,9% (w/v)
TBS-T	Tris-HCl (pH7,4)	10 mM
	NaCl	0,9% (w/v)
	Tween®-20	0,05% (v/v)
Blockierlösung	Milchpulver (gelöst in TBS-T)	5% (w/v)
Substratpuffer	Tris-HCl (pH9,5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
Färbelösung	BCIP (gelöst in 100% DMF)	0,5 mM
	NBT (gelöst in 70% DMF)	0,37 mM
	Tris-HCl (pH9,5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
Laemmli-Puffer	Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
	Saccharose	5% (w/v)
	SDS	2% (w/v)
	B-Mercaptoethanol	2% (w/v)
	Bromphenolblau	0,005 % (w/v)

3.4. Kultivierungsbedingungen

3.4.1. Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in der Regel in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Festmedium bei 37°C mit den Resistenzen entsprechenden Antibiotika (Tabelle 3-16). Die Flüssigkulturen wurden über Nacht (16 h) unter Schütteln bei 230 rpm und einer Temperatur von 37°C inkubiert. Zu einer eventuellen Verbesserung der Proteinexpression wurde die Temperatur auf 30°C oder 22°C gesenkt. 500 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden mit 250 µl sterilem Glycerin gemischt um eine Dauerkultur herzustellen. Diese wurde bei -80°C gelagert.

3.4.2. Kultivierungsbedingungen für Ascomyceten

3.4.2.1. Kultivierungsbedingungen für *Aspergillus nidulans*

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte in GMM unter der Zugabe der benötigten Auxotrophiemarker (Tabelle 3-17) bei 37°C unter Lichtausschluss. Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei 150 rpm und 37°C im Dunkeln kultiviert.

3.4.2.2. Kultivierungsbedingungen für *Aspergillus terreus*

Die Kultivierung von *A. terreus* erfolgte auf HME-Agar oder in -Flüssigmedium bei 37°C unter Lichtausschluss. Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 150 rpm unter Schütteln angezogen.

3.4.2.3. Kultivierungsbedingungen für *Chaetomium globosum*

Die Kultivierung von *C. globosum* erfolgte auf CDH-Agar oder in -Flüssigmedium bei 24°C im Dunkeln. Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 130 rpm unter Schütteln angezogen.

3.4.2.4. Kultivierungsbedingungen für *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte in flüssigem YPD- oder SC-X-Medium in einem Schüttelinkubator bei 30° unter Schütteln bei 230 rpm. Für die Anzucht auf entsprechendem Festmedium wurden die Platten bei 30°C im Brutschrank für bis zu 60 h inkubiert. Zur Produktion von Aspulvinone E wurden die jeweiligen Flüssigkulturen nach Bedarf unter Ausschluss von Licht kultiviert.

3.4.3. Herstellung einer Sporensuspension

Sporen wurden unter der Verwendung von 3-5 ml einer 0,1 % (v/v) Tween® 20-Lösung von 2-6 gut sporulierenden Platten mithilfe einer sterilen Impföse abgewaschen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur gründlichen Trennung der Sporen von eventuell vorhandenen Mycelbruchstücken und Agarresten wurden der Suspension Glasperlen (2,85-3,45 mm, Roth, Karlsruhe) hinzugefügt und das Gemisch für etwa 2 min mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt. Um die Glasperlen, Mycelüberreste und Agarreste zu entfernen wurde die Suspension im Anschluss über Watte filtriert. Die Suspension wurde bei 3000x *g* für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lagerung wurden die Sporen in 500 µl Glycerinlösung (20 % v/v) resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

3.5. Methoden der Molekularbiologie

3.5.1. Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten

Das Mycel von 3 bzw. 4 Tage alten *A. terreus* oder *C. globosum* Schüttel-Kulturen wurde über ein Filterpapier von dem Medium abgetrennt, um Wasserrückstände zu entfernen mit Küchenrollenpapier gepresst und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das Mycel unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Materialien ebenfalls vor Gebrauch in Stickstoff gekühlt wurden. 100 mg des Mycel wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt mit 1 ml DB (Tabelle 3-20) und eine Spatelspitze Proteinase K für zwei Stunden bei 50°C und 160 rpm im Schüttelheizblock inkubiert. Es wurden 1 ml Phenol/Chloroform/Isomylalkohol zugegeben und die Lösung für fünf Minuten invertiert. Bei einer Zentrifugation für sieben Minuten bei 5000 rpm und 4°C ließen sich die Phasen voneinander trennen. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang bei Bedarf wiederholt, mindestens jedoch zweimal durchgeführt. Da Phenol bei PCR-Reaktionen hinderlich sein kann erfolgte zur Entfernung von Phenolrückständen der Vorgang zum Abschluss mit einem Gemisch aus Chloroform/Isomylalkohol wiederholt. Durch die Zugabe von 80 µl 3 M Natriumacetat und 1,1 ml Isopropanol mit einer anschließenden Inkubation für 30 min bei -80°C, oder über Nacht bei -20°C, wurde die gDNA gefällt.

3.5.2. Isolierung von mRNA aus *A. terreus* und cDNA-Synthese

Das E:N.Z.A. Fungal RNA Miniprep Kit wurde verwendet um die mRNA zu isolieren. Das Mycel von 3 oder 4 Tage alten *A. terreus* Kulturen wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben zu einem feinen Pulver verarbeitet. Zur Isolierung der mRNA wurden ca. 80 mg des pulverisierten Materials nach den Angaben des Herstellers verwendet. Auch der als optional angegebene Schritt zum Verdau der DNA wurde durchgeführt. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte mit dem ProtoScript® II First Strand cDNA Aynthesis Kit (NEB) nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden sowohl die Random-, als auch Oligo d(T)₂₃ - Primer verwendet.

3.5.3. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Eine Einzelkolonie des gewünschten *E. coli* Stammes wurde von einer Platte gepickt, in 5 ml SOC-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Tabelle 3-16: Verwendete AntibiotikaTabelle 3-16) überführt und bei 37°C über Nacht kultiviert. 1 ml der Vorkultur wurde genutzt um 100 ml SOC-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum anzupflanzen. Die Zellen wurden bis zu einer Absorption von 0,3 bei 600 nm weiter kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und möglichst schnell heruntergekühlt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Zunächst wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min sedimentiert. Das entstandene Pellet wurden zweimal vorsichtig in 30 ml einer eiskalten 100 mM Calciumchlorid-Lösung gewaschen, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 3-5 ml einer 100 mM Calciumchlorid-Lösung, welche mit 15% Glycerin versetzt worden war, resuspendiert. Die Suspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 100/200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.4. Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli* Zellen

Zur Vermehrung oder der Herstellung von neuen Plasmiden wurden die Stämme XL1-Blue MRF' oder DH5α verwendet. Die zu transformierenden Plasmide wurden auf die bei -80°C gefrorenen, kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und die Zellen für 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Der Hitzeschock erfolgte durch eine Inkubation der Zellen bei 42°C für 60-90 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 230 rpm unter Schütteln inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 5900 x g für eine Minute wurden die

Zellen im Anschluss pelletiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 100 µl verworfen und das Pellet im Restmedium resuspendiert. Auf einer LB-Agar-Platte mit dem Plasmid entsprechendem Antibiotikum (Tabelle 3-16) wurden die Zellen ausplattiert. Zum Schluss fand die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht statt.

3.5.5. Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion erlaubt eine Vorauswahl von möglichen positiven Klonen bei der Herstellung von rekombinanten Plasmiden. Voraussetzung ist die Verwendung eines *E. coli* Stammes, welcher durch eine Mutation in dem sogenannten *lacZ* Gen nicht in der Lage ist, eine funktionsfähige β -Galaktosidase herzustellen. Der pGem-T® easy Vektor trägt die für die α -Untereinheit der β -Galactosidase kodierende Sequenz, welche durch die Zugabe von IPTG exprimiert wird. Das komplementierte Enzym spaltet den Farbstoff XGal (gelb) zu Galaktose und 5-5'-Dibromo-4-4'-Indigo und die Kolonien werden blau. Die erfolgreiche Integration einer DNA-Sequenz in die MCS (*multiple cloning site*) des pGem-T® easy Vektor führt wiederum zur Inaktivierung des Gens und die Kolonien bleiben weiß.

3.5.6. Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae*

5 ml YPD-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von einer 3-5 Tage alten Platte inokuliert. Nach einer Kultivierung bei 30°C und 230 rpm über Nacht wurde die Vor-Kultur verwendet um 50 ml YPD Medium auf eine Absorption von 0,3 bei einer Wellenlänge von 600 nm einzustellen. Bei einer Zelldichte mit einer Absorption von 1,2 bis 2,0 wurde die Kultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 1200 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurden mit 25 ml Wasser gewaschen, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 9500 x g für 3 min wurden die Zellen in 400 µl Lithiumacetat aufgenommen und zu je 50 µl aliquotiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und der Überstand gründlich entfernt. Nacheinander wurden vorsichtig 240 µl PEG 4000, 36 µl Lithiumacetat und 5 µl Carrier-DNA über die Zellen geschichtet. Zuletzt wurden 2-3 µl Plasmid zugegeben und die Bestandteile gründlich miteinander vermischt (erst mit der Pipette und dann mit einem Vortex-Gerät). Im Anschluss folgte eine Inkubation bei 30°C für 20 min und eine weitere bei 42°C für 30 min. Der Ansatz wurde zum letzten Mal zentrifugiert und der Überstand verworfen, bevor die Zellen in 50 µl Wasser gelöst und auf SC-X-Platten ausgestrichen wurden. Die Platten wurden für zwei bis drei Tage bei 30 °C im Brutschank inkubiert.

3.5.7. Transformation in *S. cerevisiae* nach der Freeze Methode

Für die Herstellung von kompetenten Hefezellen wurden 50 ml YPD-Medium mit 1 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur angeimpft. Nach einer Inkubation bei 30°C und 230 rpm bis zu einer optische Dichte von 0,6 bei 600 nm wurde die Kultur in ein 50 µl Reaktionsgefäß überführt. Die Kultur wurde bei 1200 x g sowie Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml Puffer A (Tabelle 3-22) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 1200 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer A aufgenommen und in Aliquots von 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

Für die Transformation der Hefe wurden zu den gefrorenen Zellen 5 µl Carrier DNA und 2 µl Plasmid-DNA hinzugefügt. Bei 37°C wurden die Zellen für 5 min inkubiert, wobei sie mehrfach vorsichtig invertiert wurden. Nach der Zugabe von 1 ml Puffer B (Tabelle 3-22) wurde der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 3 min bei 9500 x g zentrifugiert und 1 ml Überstand verworfen. Die Zellen wurden im Restmedium resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

3.5.8. Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans*

Die verwendeten Lösungen und Medien sind in Tabelle 3-18 aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Für die Transformation von *A. nidulans* wurden zuerst die Sporen von 6 - 8 gut sporulierenden Platten geerntet. Mit der Sporensuspension wurden in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben 400 ml GMM-Flüssigmedium mit den benötigten auxotrophen Markern angeimpft. Inkubation bei 28 C, 120 rpm Tischschüttler, für etwa 8 – 12 Stunden.

3.5.8.1. Protoplastierung

Erreichten die Keimschläuche eine Länge, die etwa 2-3 mal dem Konidiendurchmesser entsprachen, erfolgte die Ernte der Biomasse.

Die ausgekeimten Sporen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3500 x g für 8 min pelletiert. Das Pellet wurde mit Wasser gewaschen. Die Sporen wurden in 15 ml osmotischem Medium (Tabelle 3-18) resuspendiert und mit 100 mg „*lysingenzyme*“ aus *Trichoderma harzianum* versetzt. Die Protoplastierung erfolgte in einem 1 l Erlenmeyerkolben bei 30°C und 80 rpm für 3 – 4 Stunden. Durch mikroskopische Kontrollen wurde die Protoplastierung überprüft. Bei ausreichender Protoplastenmenge wurde die Suspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 7 ml Trapping Puffer

(Tabelle 3-18) überschichtet. Durch Zentrifugation bei 3500 x g und 4°C für 15 min sammelten sich die Protoplasten als milchig-trübe Schicht zwischen osmotischem Medium und Trapping Puffer und wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Protoplastenlösung wurde mit 1,5 mal dem Volumen kaltem STC-Puffer versetzt und die Protoplasten durch erneute Zentrifugation pelletiert. Die Protoplasten wurden vorsichtig in 1 ml kaltem STC-Puffer resuspendiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 17000 x g für 30 Sekunden bei 4°C nochmals pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 120 µl kaltem STC-Puffer (Tabelle 3-18) resuspendiert. Je 10 µl wurden für die Titerbestimmung und 10 µl für die Wasserkontrolle abgenommen.

3.5.8.2. Transformation

Zur Transformation der Protoplasten wurde das aufgereinigte Plasmid (etwa 1-3 µg) mit STC Puffer auf 100 µl aufgefüllt, gemischt und zu den 100 µl Protoplasten zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig durch Ansnipsen des Reaktionsgefäßes gemischt und für 50 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1,25 ml frisch angesetzte Calcium-PEG-Lösung (Tabelle 3-18) hinzugefügt und der Ansatz in ein steriles 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch behutsames Rollen des Reaktionsgefäßes zwischen den Händen wurde der Ansatz sanft gemischt, worauf eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min erfolgte. Anschließend wurden weitere 5 ml STC-Puffer hinzugegeben und wieder sanft gemischt. Je 600 µl des Trafoansatzes wurden auf eine Platte Bottom Medium mit dem benötigten auxotrophen Marker pipettiert. Sofort wurden 5 ml etwa 45°C warmer Top Agar mit den benötigten Zusätzen zugegeben und vorsichtig geschwenkt um den Weichagar gleichmäßig zu verteilen und die Protoplasten osmotisch einzubetten. Als Negativkontrolle wurden die Protoplasten durch die Zugabe von Wasser zerstört und auf einer Platte ohne Selektionsmarker angezogen.

3.5.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit dem benötigtem Antibiotikum versetzt und mit einem einzelnen Klon angeimpft. Die Zellen von 2 ml Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 16100 x g pelletiert und der Überstand sauber abgenommen.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden die Zellen zunächst in 250 µl Lösung I gut resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch die Zugabe von 250 µl Lösung II und vorsichtiges Mischen mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Durch die Zugabe von 250 µl Lösung III und gründliches

Mischen der Lösung wurden die chromosomale DNA und die Proteine gefällt. Die Suspension wurde bei 4 °C für 10 min bei 16100 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden 750 µl kaltes Isopropanol hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Bei 16100 x g für 15 Minuten wurde die DNA pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 400 µl eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16100 x g wurde der Ethanol verworfen und das Pellet für 10 Minuten getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 50 µl dest. Wasser gelöst.

3.5.10. Restriktion durch Endonukleasen

Zu analytischen Zwecken wurden Restriktionen in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Für eine nachfolgende Verwendung der entstandenen DNA-Fragmente wurden die Restriktionen in einem präparativen Maßstab von 50 µl angesetzt.

Die DNA-haltigen Lösungen wurden mit dem benötigten Reaktionsenzym und dem zugehörigen Reaktionspuffer vermischt und mit autoklaviertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Restriktion erfolgte für analytische Zwecke bei einer Temperatur von 37°C für 1 - 2 Stunden. Für den präparativen Maßstab wurde die Inkubationszeit auf bis zu 12 Stunden verlängert. Für nachfolgende Experimente wurde die DNA im Anschluss je nach Bedarf gereinigt oder dephosphoryliert.

3.5.11. Dephosphorylierung

Zur Verbesserung der Effizienz von anschließenden Ligationen und eine Religation der Vektoren bei den nachfolgenden Homologen Rekombination zu hemmen wurden durch Restriktion geöffnete Vektoren mit Hilfe der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) desphosphoryliert. Dafür wurde der geöffnete und aufgereinigte Vektor mit 1 µl SAP versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzymes wurde der Ansatz entweder mittels Ethanol gefällt oder für 20 min bei 65 °C inkubiert.

3.5.12. Ligation von DNA-Fragmenten

Reaktionen für eine Ligation in den pGemTeasy-Vektor wurden in einem Endvolumen von 10 µl nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Komponenten angesetzt. Die Ligrationsreaktionen in andere Vektoren wurden mit der T4-DNA-Ligase (Jena Bioscience) und dem mitgelieferten Reaktionspuffer in einem Maßstab von 20 µl durchgeführt. Die

Ligationen erfolgten bei 22°C über Nacht. Die Zusammensetzungen der Ligationsansätze finden sich in Tabelle 3-27.

Tabelle 3-27: Schemata der Ligationsansätze für pGem®T easy bzw. andere Vektoren

pGEM®T easy		andere Vektoren	
PCR-Produkt	variabel	Insert	variabel
pGEM®Teasy (50 ng/μl)	25 ng	Vektor	100-200 ng
T4-DNA-Ligase (3 Weiss units/μl)	3 Weiss units	T4-DNA-Ligase (2,5 Weiss units/μl)	2,5 Weiss units
2x Rapid ligation buffer	1x	10x T4-Ligase Puffer	1x

Für die Ligationsreaktion in die anderen Vektoren wurde in der Regel ein molares Verhältnis von linearisiertem Vektor zu Insert von 1:3 eingesetzt. Für die Berechnung der Menge an benötigtem Insert wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{Masse (Insert) [ng]} = \frac{\text{Masse (Vektor) [ng]} \times \text{Länge (Fragment) [bp]}}{\text{Läng (Vektor) [bp]}} \times 3$$

3.5.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von benötigten DNA-Sequenzen wurde mit der Expand High Fidelity™- oder der Phusion®-Polymerase nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Tabelle 3-28: Standard-Zusammensetzung des Ansatzes einer PCR

Bestandteil		High Fidelity™-Polymerase	Phusion®-Polymerase
Matrize	Plasmid-DNA	5 ng -100 ng	5 ng-100 ng
	gDNA/cDNA	500 ng – 1 μg	500 ng – 1 μg
Reaktionspuffer		1 x konzentriert	1 x konzentriert
dNTP Mix		200 μM	400 μM
Primer 1		0,4 μM	0,2 μM
Primer 2		0,4 μM	0,2 μM
Polymerase		2,5 U	2 U
DMSO (optional)		-	2,5 %

Tabelle 3-29: Standard-PCR-Programm

Phase	High Fidelity™-Polymerase			Phusion®-Polymerase		
	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	1	98°C	30 sec	1
Denaturierung	94°C	30 sec	30	98°C	10 sec	30
Annealing	T _m	1 min		T _m	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb		72°C	30 sec/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1

Die Amplifikation der NRPS-ähnlichen Gene für anschließende Fusions-PCR wurde mit der Expand High Fidelity™ Polymerase bei 53 °C durchgeführt. Die NRPS-ähnlichen Gene konnten nur mit der Expand High Fidelity™ Polymerase von cDNA amplifiziert werden. Die Annealing Temperatur lag dabei bei: *apvA* = 58 °C; *btyA* = 56 °C; *pgnA* = 60 °C und *mela* = 58 °C. Für alle anderen Amplifikationen wurde die Phusion® Polymerase mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C verwendet.

3.5.14. Homologe Rekombination in *E. coli* zur Herstellung von Konstrukten

Die zu fusionierenden DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Phusion Polymerase über eine PCR-Reaktion vervielfältigt. Die verwendeten Primer fügen dabei einen mindestens 20 bp langen komplementären Bereich für die in Zukunft benachbarten Sequenzen ein. Der Vektor wurde durch eine Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen geöffnet und anschließend dephosphoryliert. Alle DNA-Fragmente wurden aufgereinigt (Kapitel 3.5.16) und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert (Kapitel 3.5.4). Von dem Vektor wurden 100 ng und von den DNA-Fragmenten 200-300 ng eingesetzt. Das Volumen für die Transformation sollte dabei 10 µl nicht überschreiten. Für die Transformation wurden 50 µl auf Eis aufgetaute *E. coli* Zellen auf die DNA-Lösung gegeben.

3.5.15. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte nach ihrer Größe mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die gewünschte Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (Tabelle 3-21) in der Mikrowelle durch Erhitzen gelöst. Die auf circa 50°C heruntergekühlte Agaroselösung wurde mit 1x SYBR® Safe versetzt, in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und mit einem Probekamm versehen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Schlitten in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte

Gelelektrophoresekammer gesetzt und der Probenkamm entfernt. Die Proben wurden mit 6x BPB-Lösung (Tabelle 3-21) versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 5 v/cm. Als Größenstandard wurde der *Gene RuleTM DNA-Ladder Mix* verwendet. Zur Detektion der Fragmente wurden die Eigenschaften von *SYBR[®] Safe* genutzt, welches als Fluoreszenzfarbstoff in der Lage ist, in die DNA zu interkalieren. Dadurch konnten die DNA-Fragmente auf dem UV-Tisch (Image Quant 100) bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert werden.

3.5.16. Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA mit Hilfe von Ethanol

DNA wurde gereinigt bzw. ankonzentriert, indem der DNA haltigen Lösung $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. kaltes 100%iges Ethanol (p.a.) hinzugefügt wurden. Der Ansatz wurde vermischt und für 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 20180 x g für 15 min bei 4°C wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei 55°C getrocknet und in dest. Wasser resuspendiert.

3.5.17. Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung von DNA

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde am Nanodrop[®] 2000c photometrisch ermittelt. Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomicx (Ebersberg) oder von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

3.6. Methoden der Biochemie

3.6.1. Gewinnung von Proteinextrakt aus *S. cerevisiae*

Die Zellen wurden pelletiert und das Pellet verwogen. Das Gewicht des Pellets in Gramm entsprach im Folgenden einem Volumen. Das Reaktionsgefäß wurde so gewählt, dass der Inhalt 70% des Gefäßvolumens nicht überstieg. Das Zellpellet wurde in 2 Vol. vorgekühltem GBD-Puffer resuspendiert und 4 Vol. säure-gewaschene Glaskugeln (1,25-1,65 mm) wurden zugesetzt. Die Lösung wurde für drei min auf Eis inkubiert. Zum Aufbruch der Zellen wurde der Ansatz für 60 sec. bei maximaler Geschwindigkeit mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt und dann für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Diese Schritte wurden fünfmal wiederholt. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde der Aufschluss der Zellen kontrolliert. Waren die Zellen noch nicht zerstört, wurde der Aufschluss noch fünfmal

wiederholt. Nachdem die Zellen fast vollständig zerstört waren, wurden der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Glaskugeln wurden mit 2 Vol. GBD-Puffer (Tabelle 3-23) gewaschen und der Überstand in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Die festen Zellbestandteile wurden bei 12000 x g für 60 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand entsprach dem Zellextrakt und wurde in Aliquots von 100 µl oder 200 µl bei -80°C gelagert.

3.6.2. Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose

Der zuvor gewonnene Proteinrohextrakt wurde mit 250-500 µl Ni-NTA-Agarose versetzt und mindestens für eine Stunde auf Eis vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde auf einen leeren Säulenkörper mit Fritte überführt und die Ni-NTA-Agarose mit angeheftetem Protein zweimal mit vier bzw. acht ml Waschpuffer gespült. Das His-tag-Fusionsprotein wurde mit 500 µl Elutionspuffer eluiert. Zum Entsalzen wurde die Elutionsfraktion auf eine vorher mit Proteinlagerungspuffer äquilibrierte NAP5- oder PD10-Säule aufgetragen und mit 1 bzw. 3,5 ml Proteinlagerungspuffer eluiert. Die proteinhaltige Lösung wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Von allen Aufreinigungsschritten wurden Proben gezogen und diese mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.6.3) analysiert.

3.6.3. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli 1970). Nach Tabelle 3-25 wurde zuerst das Trenngel und nach dessen Aushärtung das Sammelgel gegossen. Die Proteinlösungen wurden mit 6x Probenpuffer gemischt und im Anschluss bei 100°C für 10 Minuten denaturiert. Als Größenstandard diente der Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis. Die Elektrophorese erfolgte einmal SDS-Laufpuffer bei 180 V und 400 mA. Die Gele wurden in Coomassie-Färbelösung gefärbt und in Entfärbelösung entfärbt.

3.6.4. Proteinnachweis mittels Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern. Die Proteine werden zuerst mittels SDS-PAGE aufgetrennt auf eine Membran übertragen und dann mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Die hierzu verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3-26 zu finden.

3.6.4.1. Probenentnahme und Zellaufschluss

Die Absorption bei 600 nm (OD_{600nm}) der *S. cerevisiae* Kultur, die die Proteine überproduzieren sollten, wurde gemessen. Bei einer Absorption von 1 wurde 1 ml der Kultur entnommen. Höhere oder niedrigere Absorptionswerte wurden durch die Entnahme des nach der folgenden Formel errechneten Volumens ausgeglichen.

$$\text{Probenvolumen [ml]} = \frac{OD_{600nm} \text{ von } 1 \times 1 \text{ ml}}{OD_{600nm} \text{ aktuell}}$$

Die Probe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für drei Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl Roedel-Mix (Tabelle 3-26) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden dem Ansatz 125 µl einer 65 %igen TCA-Lösung (w/v) (Endkonzentration: 13 % TCA) zugegeben und für weiter 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden bei 17.000 x g für 10 min bei 4 °C gefällt, das Pellet mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und bei 56 °C getrocknet. Die Proteine wurden in 100 – 200 µl Laemmli-Puffer resuspendiert und 10 µl für die anschließende Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-Page bei 100 °C für 10 min denaturiert. Die SDS-PAGE wurde wie in Kapitel 3.6.3 durchgeführt, allerdings wurde als Größenstandard für den nachfolgenden Western Blot der Precision Plus Protein™ All Blue Standard verwendet.

3.6.4.2. Proteinnachweis

Zur Vorbereitung des *Blotting* Prozesses wurden die PVDF-Membran und zwei Filterpapiere auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten (ca. 8,5 x 6 cm) und die Filterpapiere und zwei Schwammtücher mit Towbin-Puffer durchdrängt. Außerdem wurde die Membran mit Methanol benetzt mit bidest. Wasser gewaschen und danach für 5 -30 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde ebenfalls im Towbin-Puffer äquilibriert. Die Bestandteile wurden in der Kassette der Wet-Blot-Apparatur wie folgt übereinandergeschichtet: Schwammtuch, Filterpapier, SDS-Gel, PVDF-Membran, Filterpapier, Schwammtuch. Die Kassette wurde mit der Membran in Richtung Kathode in die mit eiskaltem Towbin-Puffer gefüllte Kammer eingesetzt, damit die negativ geladenen Proteine von dem SDS-Gel auf die Membran übertragen werden. Bei 4 °C, 100 V und 400 mA wurden die Proteine in 45 min auf die Membran übertragen. Um eine gleichbleibende Temperatur während der Proteinübertragung zu gewährleisten wurde die Kammer mit Eis

gekühlt und der Towbin-Puffer mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Anschließend wurde die Blot-Kassette auseinandergebaut und das SDS-Gel für eine Überprüfung des Transfers gefärbt. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte der Membran wurden für jeweils 5 min auf einem Schüttler durchgeführt. Zunächst wurde die Membran dreimal mit TBS-Puffer gewaschen und für die nachfolgende Immundetektion bei 4°C über Nacht in Blockierlösung inkubiert. Zur Entfernung der Blockierlösung wurde die Membran zweimal in TBS-T-Puffer gewaschen. Danach wurde der Primär-Antikörper (1:1000 bis 1:10.000 verdünnt in 1x TBS-T-Puffer) für 2 Stunden zugegeben. Der überschüssige Primär-Antikörper wurde durch achtmaliges Waschen TBS-T-Puffer entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (1:1000 bis 1:10.000 verdünnt in 1x TBS-T-Puffer) erfolgte für eine Stunde. Die Membran wurde fünfmal mit TBS-T-Puffer gewaschen und im Anschluss für fünf Minuten in dem Substratpuffer äquilibriert. Die Membran wurde aus dem Substratpuffer entnommen und vorsichtig mit der Färbelösung beträufelt. Für die Farbreaktion wurde die Membran abgedunkelt. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde die Membran zum Fixieren dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.7. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten

3.7.1. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *S. cerevisiae*

Zur Analyse der Sekundärmetabolite wurde die Plasmid tragenden *S. cerevisiae* Kulturen in 50 ml SC-X-Medium unter Schütteln bei 230 rpm und 30 °C in der Regel für 48 Stunden, maximal aber für 5 Tage, kultiviert. Für den präoperativen Maßstab wurden 500 ml – 2 l SC-X-Medium bei den gleichen Bedingungen kultiviert. Die gesamte Kultur wurden dreimal mit 1:1 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und bis zur Trockene eingeeengt. Das Pellet wurde in 1 ml Methanol resuspendiert und die Sekundärmetabolite an einer HPLC detektiert. Für die Kulturen, die Pulvinon produzieren erfolgte die Kultivierung unter Lichtausschluss.

3.7.2. Isolierung von Sekundärmetaboliten aus *A. nidulans*

Zur Analyse der Sekundärmetabolite wurde der *A. nidulans* Stämme TN02A7 oder GR5 und die aus diesen resultierenden Transformanten in 100 ml GMM unter Schütteln bei 130 rpm für 5-6 Tage bei 37 °C im Dunkeln kultiviert. Anschließend wurde das Mycel abfiltriert und für spätere Experimente bei -80 °C gelagert. Die Kulturfiltrate wurden zweimal mit 1:1 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und bis zur

Trockene eingengt. Das Pellet wurde in 1 ml Methanol resuspendiert und die Sekundärmetabolite an einer HPLC analysiert.

3.7.3. Analytische Methoden

3.7.3.1. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)

Analysen von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten und die Isolierung enzymatischen Produkten wurde an Anlagen der 1200er- oder 1260er-Serie von Agilent durchgeführt. Zu analytischen Zwecken wurde eine Flussrate von 1 ml/min für eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) verwendet. Zum Schutz der Hauptsäule wurde eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) vorgeschaltet. Die Isolierung von enzymatischen Produkten erfolgte über einen Multospher RP-18 (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm), welcher ebenfalls eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm) vorgeschaltet war. Die Detektion erfolgte mit einem Photodioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 277 bzw. 296 nm. Die zur Trennung verwendeten Fließmittelkomponenten wurden in einem Gradientensystem verwendet und sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 3-30: Gradient zur Analytik der *A. nidulans* Transformanten

Phase		
Einspülen der Säule	5 % B	5 min
Elutionsgradient	5 – 100 % B	50 min
Spülen der Säule	100 % B	5 min

Zur Isolierung der Produkte wurde eine Flussrate von 3 ml/min angewendet.

Tabelle 3-31: Gradient zur Isolierung von Butyrolacton IIa, Aspulvionen E und Atromentin

Phase	Butyrolactone IIa		Aspulvinon E/Atromentin	
Einspülen der Säule	10 % B	5 min	10 % B	5 min
Elutionsgradient	10 – 25 % B	5 min	20 – 35 % B	10 min
Elutionsgradient	25 – 32 % B	15 min	35 – 40 % B	10 min
Spülen der Säule	95 % B	10 min	95 % B	10 min

Tabelle 3-32: Gradient zur Isolierung von Phenguignarsäure und Didemethylasterrichinon D

Phase	Phenguignarsäure		Didemethylasterrichinon D	
Einspülen der Säule	10 % B	5 min	10 % B	5 min
Elutionsgradient	45 – 50 % B	15 min	10 – 65 % B	10 min
Elutionsgradient	50 – 60 % B	25 min	65 – 80 % B	10 min
Spülen der Säule	95 % B	5 min	95 % B	5 min

Die Produkte der Hybrid-Enzyme wurden bei einer Flussrate von 5 ml/min isoliert.

Tabelle 3-33: Gradient zur Isolierung von den Produkten der NRPS-ähnlichen Hybrid-Enzyme

Phase	Hydroxyphenguignarsäure/ Phenylbutyrolacton IIa		Indolguignarsäure/ Indolbutyrolacton IIa	
Einspülen der Säule	10 % B	5 min	10 % B	5 min
Elutionsgradient	10 – 35 % B	15 min	10 – 55 % B	10 min
Elutionsgradient	35 – 45 % B	25 min	55 – 68 % B	20 min
Spülen der Säule	95 % B	5 min	95 % B	5 min

Die LC-MS Analysen wurden an einer 1260er-Serie Anlage von Agilent durchgeführt, die mit einem micrOTOF-QIII Massenspektrometer gekoppelt war. Zur Auftrennung wurde eine Multospher 120 RP Säule (5 µl, 250 x 2 mm) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Wasser (A) und Acetonitril (B), die jeweils mit 0,1 % Ameisensäure versetzt waren, wurden als Fließmittel benutzt. Die beiden verwendeten Methoden sind in Tabelle 3-34 dargestellt. Die Parameter des Massenspektrometers wurden wie folgt eingestellt: Elektrospray-Positiv- oder Negativionenmodus für die Ionisierung, Kapillarspannung mit 4,5kV und Kollisionsenergie mit 8,0 eV. Die Messungen wurden von Rixa Kraut, Lena Ludwig-Radtke oder Nadja Braun durchgeführt.

Tabelle 3-34: LC-MS Methoden

Phase	Kurze Methode		Lange Methode	
Einspülen der Säule	5 % B	5 min	5 % B	10 min
Elutionsgradient	5 – 100 % B	10 min	5 – 100 % B	40 min
Spülen der Säule	100 % B	5 min	100 % B	5 min

3.7.3.2. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Strukturen der Produkte von den NRPS-ähnlichen Enzymen wurden über Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und mindestens für eine Nacht im Gefriertrockner getrocknet. Die Substanzen wurden in einem deuterierten Lösungsmittel aufgenommen (Tabelle 3-1) und an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, Akishima, Tokio, Japan) von Frau Dr. Regina Ortmann oder Herrn Stefan Newel vermessen.

3.7.3.3. Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Spektren wurden auf einem J-815 CD-Spektrometer (Jasco Deutschland GmbH, Pungstadt) aufgenommen. Die Proben wurden in Methanol gelöst und im Bereich von 200 – 400 nm unter Verwendung eine 1 mm Quarzküvette (Hellma Analytics, Müllheim) gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen von putativen NRPS-ähnlichen Genen aus *A. terreus* und *C. globosum*

4.1.1. Expressionsversuche von NRPS-ähnlichen Genen mit eigenem Promotor- und Terminatorbereich in *A. nidulans*

4.1.1.1. Einleitung

In dem Genom von *A. terreus* waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit fünf Gene identifiziert worden, die für putative NRPS-ähnliche Enzyme mit einer A-T-TE Domänenstruktur kodieren (Khaldi et al 2010). In Deletionsexperimenten konnte eine Beteiligung von vier der NRPS-ähnlichen Enzyme an der Biosynthese von Grundgerüsten für verschiedene Sekundärmetabolite belegt werden (Guo et al 2013). So ist ATEG_02004 (*apvA*) in die Produktion von Aspulvinonen involviert, für die eine Wirkung gegenüber dem Influenza Virus nachgewiesen werden konnte (Gao et al 2013a). ATEG_02815 (*btyA*) scheint das Grundgerüst der Butyrolactone zu synthetisieren. Eine Beteiligung von ATEG_00700 an der Bildung von Bisindolylbenzochinonen wird neben der Deletion des Gens in *A. terreus* zusätzlich durch die Untersuchungen an TdiA, dem Homologen Protein aus *A. nidulans*, gestützt. ATEG_03563 konnte anhand der Deletionsexperimente kein enzymatisches Produkt zugeordnet werden. Allerdings scheint es an der Produktion von Melanin, dem Pigmentfarbstoffe in den Sporen, mitzuwirken. Die Deletion von ATEG_08899 hatte keinen Einfluss auf das Profil der Sekundärmetabolite der *A. terreus* Kulturen und dem Gen konnte kein Produkt zugeordnet werden. Ein weiteres putatives NRPS-ähnliches Enzym (ATEG_03090), welches nach den Vorhersagen jedoch nur aus einer A/T-Domäne besteht, wurde ebenfalls deletiert, jedoch ohne Hinweis auf das zugehörige Produkt.

Die NRPS-ähnlichen Gene sollten in den *A. nidulans* Stamm TN02A7 eingebracht werden (Tabelle 3-6). Dieser Stamm besitzt aufgrund von Mutationen in dem Gen *pyroA* (Untereinheit A der Pyridoxal 5'-phosphate Synthase) und dem Gen *pyrG* (Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase) eine Auxotrophie sowohl für Pyridoxin, als auch für Uridin/Uracil. Eine Komplementation der Gene ermöglicht eine Selektion der positiven Transformanten durch die Kultivierung ohne Zugabe der jeweiligen Substanz in das Medium. Des Weiteren verringert die *nukA* Deletion das Vorkommen von nicht-homologen Rekombinationsereignissen (Nayak et al. 2006). Der für die Transformation von *A. nidulans* verwendete Vektor pJW24 enthält *pyrG* aus *A. parasiticus* als Selektionsmarker (Calvo et al.

2004). Ansonsten besitzt er jedoch keine Elemente, welche eine zielgerichtete Einbringung der gewünschten Sequenz in das Genom ermöglicht. Somit kann nur eine zufällige (ektopische) Integration der Plasmid-DNA stattfinden. Des Weiteren finden sich in pJW24 keine Promotor- und Terminatorsequenzen, die eine zuverlässige Expression der Fremdgene ermöglichen würden. Daher wurden in bereits von Dr. Carsten Wunsch und Dr. Sylwia Tarcz an den NRPS-ähnlichen Genen ATEG_02004, ATEG_03090 ATEG_03653 und ATEG_08899 durchgeführten Arbeiten die Gene mit ihren eigenen Promotor- und Terminatorsequenzen kloniert (Tabelle 4-1) (Tarcz 2014; Wunsch 2014).

Tabelle 4-1: Übersicht über die vorhandenen NRPS-ähnlichen enthaltenen Plasmide

Gen	Vektor	Plasmid	Promotor	Gen	Terminator
ATEG_02004	pJW24	pST38	506	2779	163
ATEG_03563	pJW24	pST33	511	2779	496
ATEG_03090	pJW24	pCaW6	906	2532	538
ATEG_08899	pGemT® easy	pST31	466	2841	482

Da es für Ascomyceten jedoch keine adäquaten Vorhersagemöglichkeiten zur exakten Identifizierung von Promotoren und Terminatoren gab, wurden pauschal etwa 500 bp für die Promotor- und Terminatorsequenzen einkalkuliert und bei der Amplifikation der Sequenzen aus der gDNA von *A. terreus* ergänzt. Bei erfolgreicher Transformation der vorhandenen Konstrukte sollten die Gene ATEG_02815 und ATEG_00700, für die bis zu diesem Zeitpunkt kein Konstrukt vorlag, ebenfalls in den Expressionsvektor integriert und in *A. nidulans* transformiert werden.

4.1.1.2. Transformation von ATEG_03563 und ATEG_03090 mit ihren Promotor- und Terminatorbereichen in *A. nidulans* TN02A7

Die in der Arbeitsgruppe vorliegenden Expressionskonstrukte pST33 (ATEG_03653), pST38 (ATEG_02004) und pCaW6 (ATEG_03090) wurden von Dr. Carsten Wunsch und Dr. Sylwia Tarcz zur Verfügung gestellt (Tabelle 4-1) (Tarcz 2014; Wunsch 2014). Die erhaltenen Konstrukte wurden einem Kontrollverdau unterzogen, um die Richtigkeit der Plasmide zu überprüfen. Alle Restriktionshydrolysen wiesen das erwartete Bandenmuster auf und bestätigten damit die Identität der Plasmide (Abbildung 4-1).

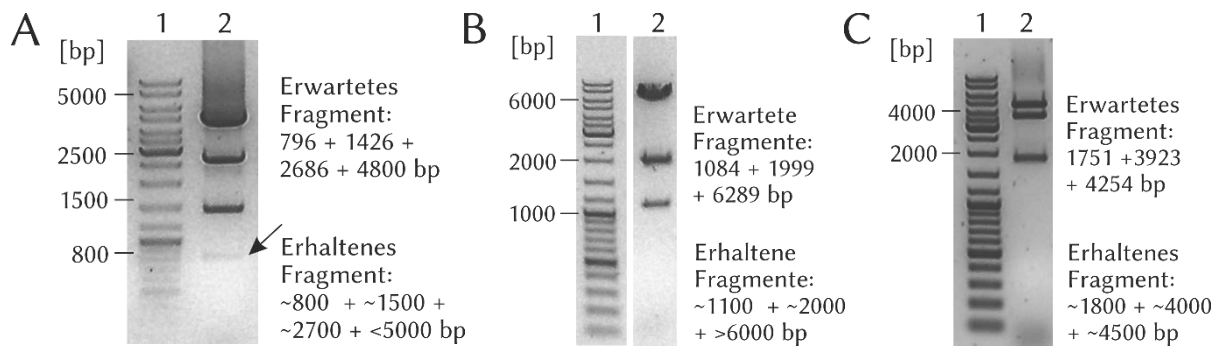


Abbildung 4-1: 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters der Expressionskonstrukte. A pST33 mit *Hind*III verdaut; B pST38 mit *Nco*I verdaut; C pCaW6 mit *Eco*RI verdaut. 1: DNA-Größenstandard; 2: Ergebnis des Plasmidverdaus

Im Folgenden wurden die Expressionskonstrukte wie in Kapitel 3.5.8 beschrieben mittels Ca^{2+} -PEG-Protoplastion und anschließender Transformation in das Genom des *A. nidulans* Stamm TN02A7 inseriert.

Für pST38 konnten auch nach mehrfachen Transformations-Versuchen, bei denen die Plasmid-DNA für einen höhere Effizienz der Transformation zusätzlich mit *Dra*I linearisiert worden war, keine Transformanten generiert werden.

Die bei der Transformation von pST33 erhaltenen Kolonien konnten nach 3 Tagen Inkubationszeit auf GMM-Platten vereinzelt werden. Nach mehrfachem Umsetzen auf neue Selektionsplatten blieben 4 Transformanten erhalten. Zur Überprüfung der Integration von ATEG_03653 ins Genom wurde die gDNA mit Phenol-Chlorophorm extrahiert (Kapitel 3.5.1) und eine 3322 bp lange Sequenz mit dem Primerpaar 03563 Fus fwd und 3563_wA do amplifiziert (Abbildung 4-2: Laufspuren 2-5). Als Negativkontrolle diente die gDNA von *A. nidulans* TN02A7 (Abbildung 4-2: Laufspure -) und als Positivkontrolle das Plasmid pST33 (Abbildung 4-2: Laufspure +).

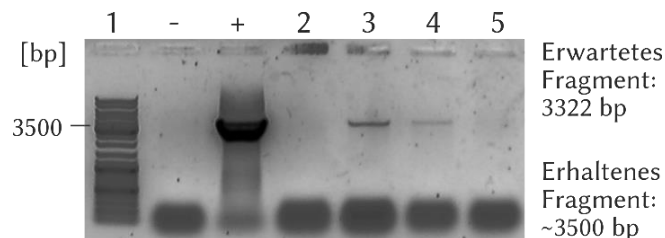


Abbildung 4-2: 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der Kontroll-PCR für die Transformation mit pST33. 1: DNA-Größenstandard; -: negativ Kontrolle *A. nidulans* TN02A7 +: positiv Kontrolle pST33; 2-5: PCR-Produkte der Transformanten *A. nidulans* EH01-EH04

Obwohl nur die Transformanten EH02 und EH03 ein PCR-Produkt aufwiesen wurden zur Untersuchung der Sekundärmetabolite von allen Transformanten sowie auch von

TN02A7 als Negativkontrolle die Sporen geerntet und mit diesen 100 ml GMM-Flüssigmedium beimpft. Die Kultivierung erfolgte für sechs Tage bei 30 °C und 140 rpm unter Lichtausschluss. Das Medium wurde mit Hilfe eines Filters von dem Mycel getrennt und zweimal mit 1:1 Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Am Rotationsverdampfer wurde die organische Phase bis zur Trockene eingengt, in Methanol rückgelöst und schließlich an der HPLC analysiert (Abbildung 4-3). Obwohl die Transformanten EH02 und EH03 nachweislich das Gen ins Genom integriert hatten, zeigte die Analyse der Chromatogramme keine neuen Peaks für eine Produktion eines zusätzlichen Stoffes.

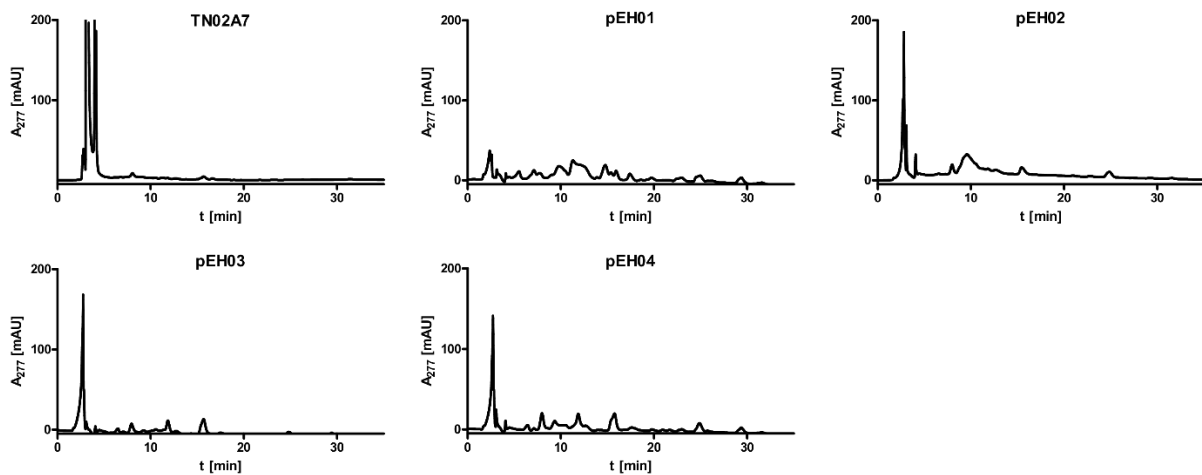


Abbildung 4-3: HPLC Chromatogramme der Extrakte von den Kulturüberständen der Transformanten im Vergleich mit dem untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 in GMM.

Für die Transformation von *A. nidulans* TN02A7 mit dem Konstrukt pCaW6 konnten nach drei Selektionsrunden auf Uridin-/Uracil-freiem Medium fünf Transformanten erhalten werden. Die genomische DNA der Transformanten sowie von TN02A7 wurde extrahiert und für eine PCR mit den Primern 3090_Seq_f und 3090_wA do eingesetzt (Abbildung 4-4). Bei allen Transformanten konnte im Agarosegel eine 1024 bp großes Fragment beobachtet werden, das in der Größe mit dem Fragment der positiv Kontrolle übereinstimmen (Abbildung 4-4 Laufspur +). Die Intensität der Banden entsprach jedoch eher der für die Negativkontrolle beobachteten Bande (Abbildung 4-4 Laufspur -).

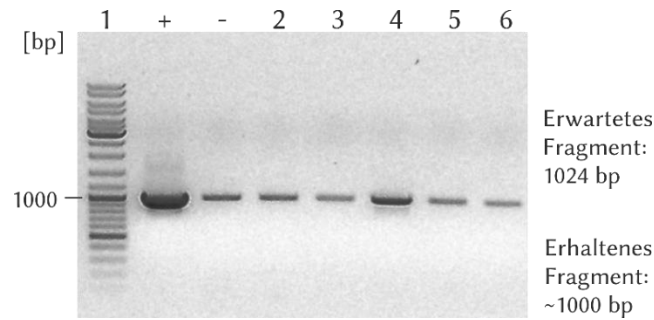


Abbildung 4-4: 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der Kontroll-PCR für die Transformation mit pCaW6. 1: DNA-Größenstandard; -: negativ Kontrolle *A. nidulans* TN02A7 +: positiv Kontrolle pCaW6; 2-6: Transformanten

Trotz der hohen Wahrscheinlichkeit, dass die getesteten Kulturen keine wahren Transformanten waren, wurden die Kulturen wie zuvor beschrieben kultiviert und die Sekundärmetabolite extrahiert (Abbildung 4-5). Leider konnten anhand der UV-Detektion keine Produktion von neuen Metaboliten nachgewiesen werden.

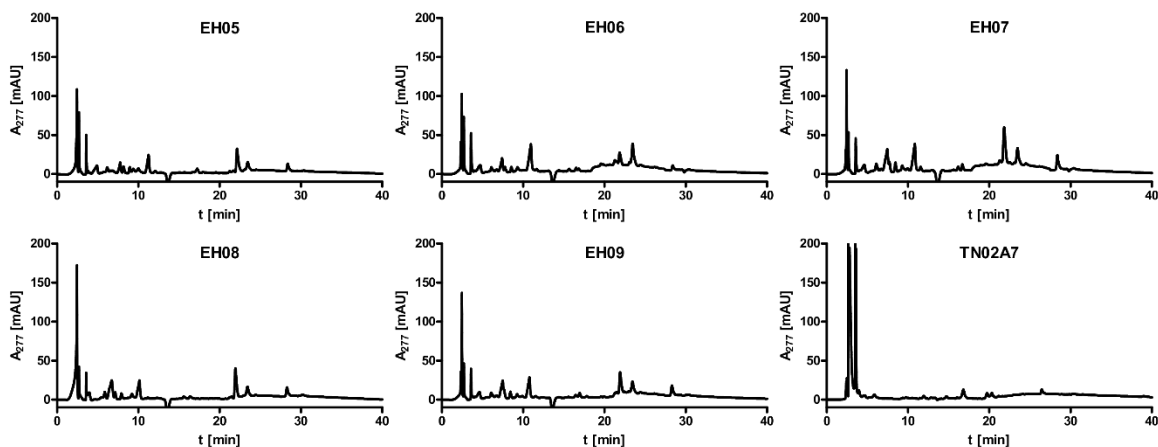


Abbildung 4-5: Chromatogramme der Extrakte von den Kulturüberständen der Transformanten im Vergleich mit dem untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 jeweils 6 Tage in GMM.

4.1.1.3. Expression von ATEG_03563 inklusive seiner Promotor und Terminatorsequenz in *A. nidulans* GR5

Wie schon erwähnt ist *A. nidulans* TN02A7 für eine ektopische/zufällige Einbringung von Genen kein optimaler Stamm, da die Deletion des *nukA* Gens eine Reduktion von Heterologen Integrationsereignissen zur Folge hat. Freundlicherweise wurde von Prof. Dr. Reinhard Fischer der *A. nidulans* Stamm GR5 weitergeben (Osherov and May 2000). Dieser hat neben Mutationen in der Auxotrophiemarkergenen *pyrG* und *pyroA* auch eine Mutation in dem Gen *veA*, welches eine sexuelle Vermehrung des Pilzes hemmt (Calvo 2008). Außerdem ist in GR5 das *wA* deletiert, welches in *A. nidulans* an der Biosynthese den grünen

Farbestoffes in den Sporen beteiligt ist (Mayorga and Timberlake 1992). Die PCR-Amplifikation des 1083 bp langen Sequenzabschnittes von ATEG_03563 mit der Primerkombination 3563-K-fwd und 3563_wAdo führte für alle getesteten Transformaten zu einem Produkt, allerdings auch bei der negativ Kontrolle. Zur weiteren Kontrolle wurden die PCR-Produkte mit *NcoI* verdaut. Die Hydrolyse der PCR-Produkte bestätigte eindeutig die Integration der Sequenz in das Genom für die *A. nidulans* Transformaten EH10-24 (Abbildung 4-6).

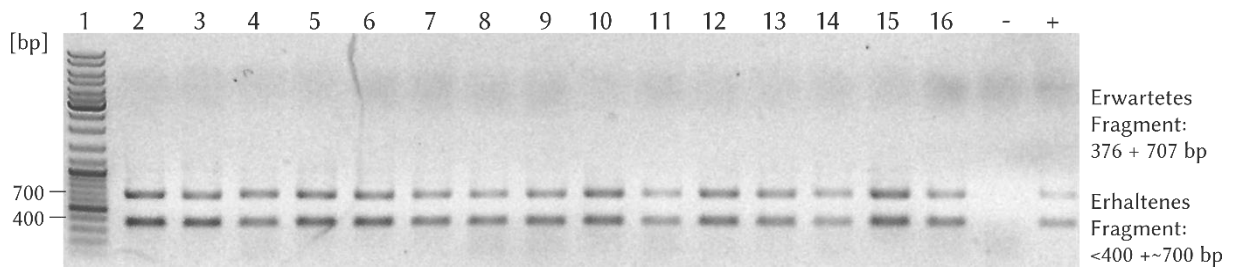


Abbildung 4-6: 1%iges Agarosegel der Hydrolyse des 1083 bp großen PCR-Produktes von ATEG_03653 mit *NcoI* zur Überprüfung auf positive Transformaten 1: DNA-Größenstandard; -: negativ Kontrolle *A. nidulans* TN02A7 +: positiv Kontrolle pST33; 2-6: Transformaten

Zur Analyse der produzierten Sekundärmetabolite wurden die Transformaten in Glucose-Minimalmedium mit den notwendigen Zusätzen kultiviert. Nach dem Abfiltrieren wurde das Medium mit Ethylacetat extrahiert und das Extrakt bis zur Trockene eingengt. Die isolierten Sekundärmetabolite wurden schließlich mittels HPLC detektiert. Leider konnten im Vergleich zum untransformierten *A. nidulans* Stamm GR5 keine neuen Peaks beobachtet werden.

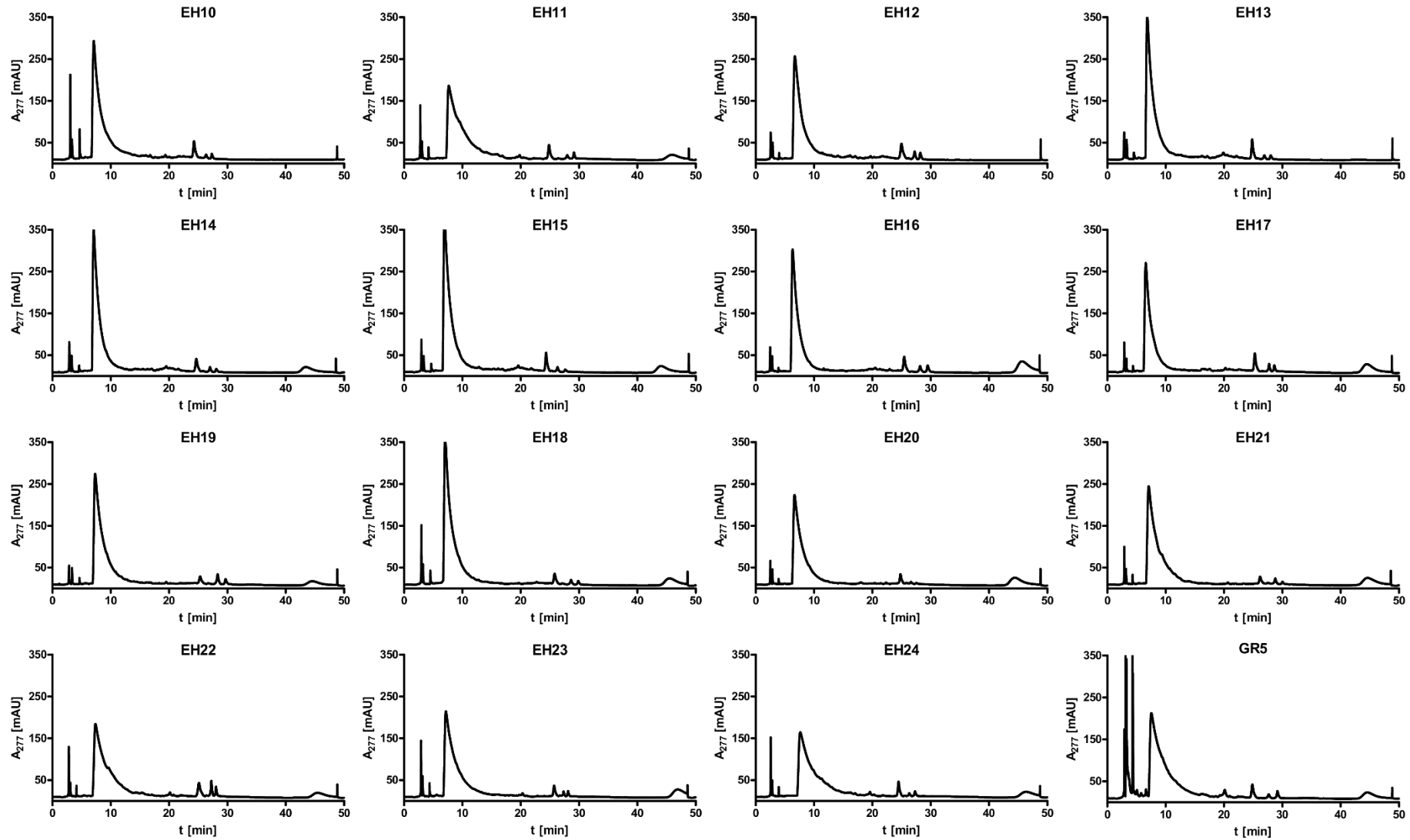


Abbildung 4-7: Chromatogramme der Extrakte von den Kulturüberständen der Transformanten im Vergleich mit dem untransformierten Stamm *A. nidulans* GR5 jeweils 6 Tage in GMM.

4.1.1.4. Klonierung und Transformationsversuche von ATEG_08899

Das Gen ATEG_08899 lag bisher nur in dem Klonierungsvektor pGemT® easy (pST31) vor. Der Versuch die Sequenz für eine weitere Klonierung aus dem Vektor herauszuschneiden scheiterte. Daher wurden alle vorhandenen Aliquots von pST31 mittels Restriktionshydrolyse auf ein korrektes Plasmid getestet. Nur eines der Reaktionsgefäße enthielt das richtige Plasmid. Nun konnte die gewünschte Sequenz mit *NotI* und *XbaI* aus dem Vektor herausgeschnitten und der Vektor mit *DraI* hydrolysiert werden. Nach der Aufreinigung der DNA wurde das Fragment in den geöffneten pJW24 Vektor transformiert. Das erhaltene Konstrukt wurde zur Kontrolle der korrekten Insertion mit *BglII* und *NcoI* verdaut und letztendlich als pEH1 bezeichnet (Abbildung 4-8).

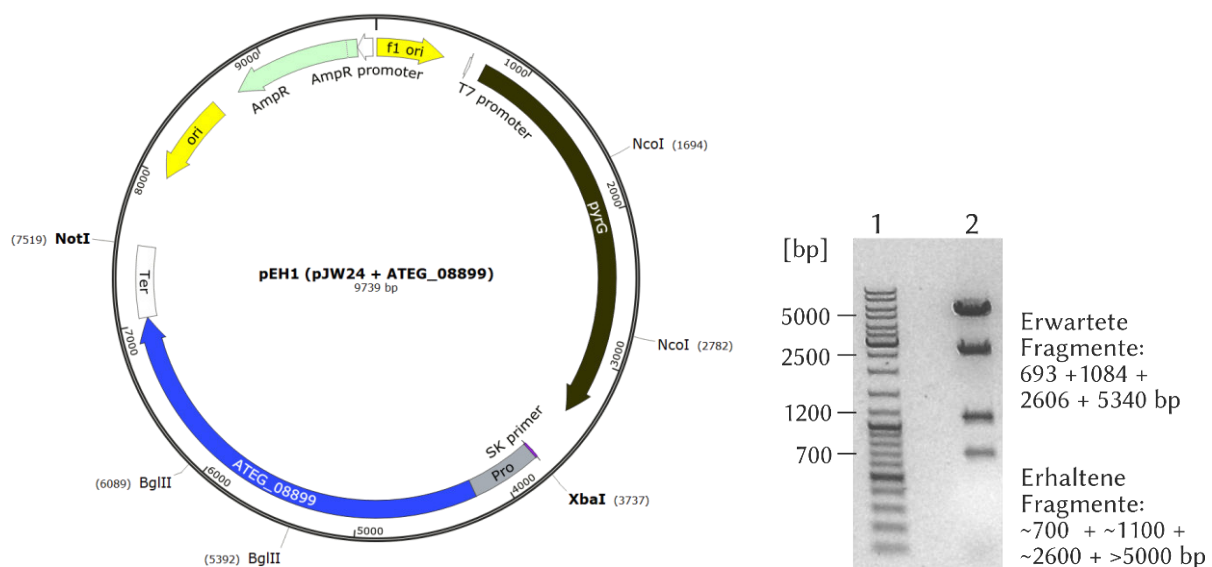


Abbildung 4-8: Vektorkarte von pEH1 (ATEG_08899 in pJW24) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. *NotI* und *XbaI* wurden zur Umklonierung verwendet. *BglII* und *NcoI* zur wurden zur Restriktionskontrolle verwendet. Ter: Terminator; Pro: Promotor

Das Plasmid wurde anschließend für die Transformation von *A. nidulans* TN02A7 eingesetzt. Die nach drei Tagen gewachsenen Kolonien wurden mehrmals auf Uridin-/Uracil-freiem Medium selektiert. Für die sieben überbleibenden Kolonien wurde zur Überprüfung der Insertion von ATEG_08899 ein PCR-Nachweis unter der Verwendung des Primerpaares 8899-K-fwd und 8899_wA durchgeführt (Abbildung 4-9).

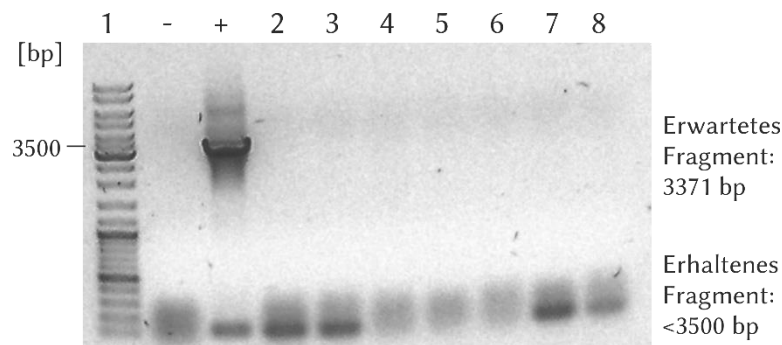


Abbildung 4-9: 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der Kontroll-PCR für die Transformation mit pEH1.
 1: Marker; -: negativ Kontrolle *A. nidulans* TN02A7 +: positiv Kontrolle pEH1; 2-8: Transformanten

Die Insertion von ATEG_08899 ins Genom von *A. nidulans* TN02A7 konnte leider für keinen der Transformanten nachgewiesen werden. Daher wurde von einer Kultivierung zur Analyse der Produktion von Sekundärmetaboliten abgesehen.

4.1.1.5. Strategiewechsel und Klonierungsversuche

Da die ektopische Integration und die Verwendung der Promotor- und Terminatorbereiche der untersuchten Gene nicht erfolgreich waren, sollte die Expression der NRPS-ähnlichen Gene unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *gpdA* gestellt werden. Als Terminator sollte der *trpC*-Terminator verwendet werden. Außerdem sollten die Gene gezielt über Homologe Rekombination in einen definierten Bereich des Genoms integriert werden. Für diese Ziele wurde Stamm *A. nidulans* LO4389 (Ahuja et al. 2012) ausgewählt. Dieser besitzt, außer den auxotrophe Mutationen in den *pyrG*, *riboB* und *pyroA*-Genen, eine *nukA*-Deletion (Nayak et al. 2006), wodurch die Anzahl der nicht homologen Rekombinationen reduziert werden. Des Weiteren ist das Cluster für die Synthese von Sterigmatocystin deletiert, welches eines der Hauptmetabolite in *A. nidulans* darstellt (Chiang et al. 2009; Yu and Leonard 1995) und die Detektion der Syntheseprodukte der heterolog exprimierten Gene erschwert. Die Konstrukte für die Transformation von *A. nidulans* LO4389 sollten auf dem Vektor pWY17 basieren (Abbildung 1-3). Dieser enthält die 1000 kb langen Sequenzen *upstream* bzw. *downstream* des *wA* Gens, welches maßgeblich an der Synthese der grünen Pigmente in den Konidiosporen beteiligt ist. Da bei erfolgreicher Rekombination in den *wA*-Locus die bisher grünen Kolonien weißlich bis graue Sporen aufweisen, erleichtert dies die Suche nach positiven Transformanten.

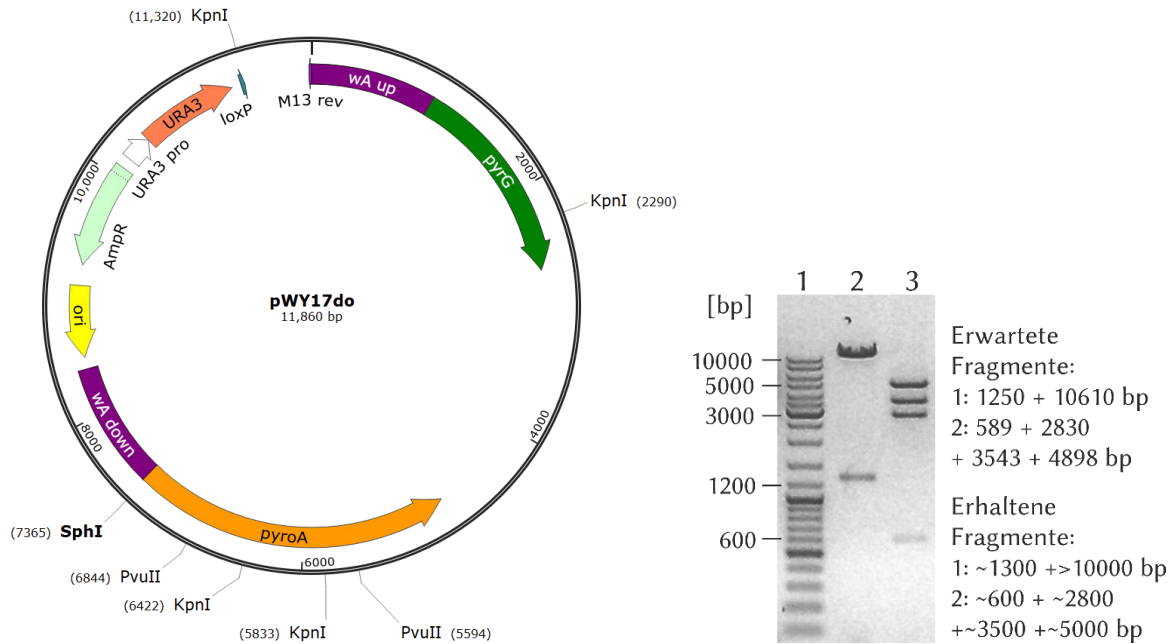


Abbildung 4-10: Vektorkarte von pWY17do und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pWY17do mit *PvuII* verdaut; 3: pWY17do mit *KpnI* verdaut.

Die Sequenz des *gpdA* Promotors lag auf dem von Dr. Kathrin Mundt zur Verfügung gestellten Plasmid pKM 28 vor (Mundt 2013). Sie wurde C-terminal mit einem 20 bp langen Überhang zu *pyrG* (Primer: *pyrG_gpdA*) und N-terminal mit einem Überhang für einen HIS₆-Tag (Primer: *gpdA rvs*) amplifiziert und in den pGemT® easy Vektor ligiert. Die Kolonien wurden mittels Blau-Weiß-Screening sortiert und potenziell positive Klone in Flüssigmedium kultiviert. Das isolierte Plasmid wurde mit *EcoRI* verdaut und sequenziert.

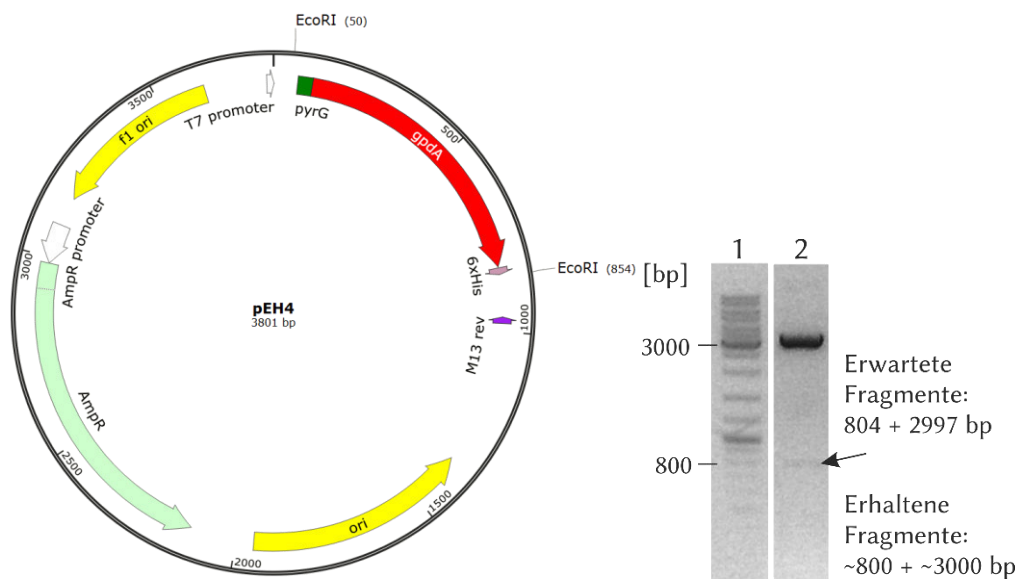


Abbildung 4-11: Vektorkarte von pEH4 (*gpdA* in pGemT® easy) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH4 mit *EcoRI* verdaut.

Für die Amplifikation der Gene wurden forward Primer konstruiert, die - wie der revers Primer von *gpdA* - einen Überhang für ein Startkodon und den 6x HIS-Tag besitzten (s. Methoden: 8899 Fus fwd, 03563 Fus fwd, 03090 Fus fwd, *gpdA_2004*). Für die revers Primer wurden Überhänge von 40 bp von *wA_down* für die Homologe Rekombination in Hefe angefügt (s. Methoden 8899 *wA do*, 03563 *wA do*, 03090 *wA do*, 2004 *wA do*). Außer *ATEG_03090* konnten alle Gene mit der erwartenten Fragmentgröße amplifiziert werden (s. Abb 7). Für die Amplifikation mittels Hifi-Polymerase wurde eine einminütige Elongationszeit und 53°C als Annealing Temperatur benutzt.

Die PCR-Produkte wurden über eine Gelextraktion aufgereinigt. Das mit *gpdA* zu fusionierenden Gen wurde Verhältnis 1:4, 1:1 und 3:1 für die Fusions-PCR eingesetzt. Auch wurde versucht, die äußeren Primer zu den Reaktionsansätzen hinzuzufügen und zusätzlich die Zugabe von DMSO. Trotz aller Versuche konnten in keinem der PCR-Ansätze die Bande von 4000 bp, welche dem Fusionsprodukt entspräche, gefunden werden.

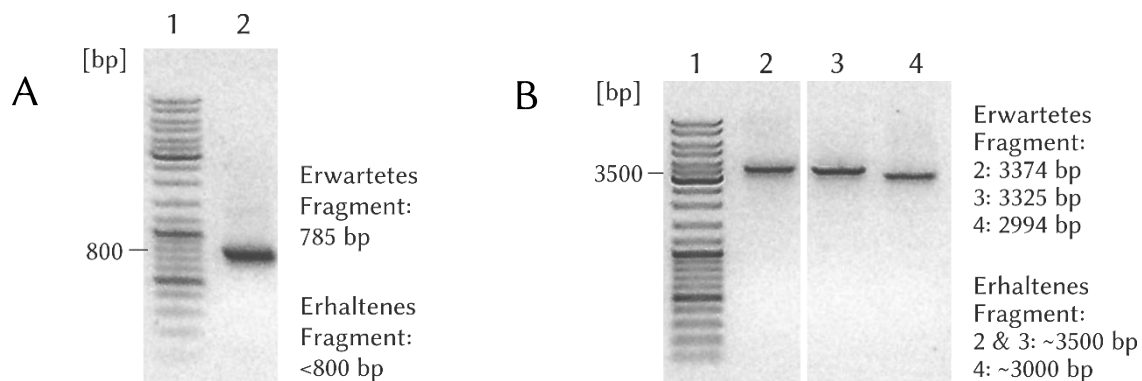


Abbildung 4-12: 1%iges Agarosegel der PCR-Amplifikate des A) *gpdA*-Promotors und B) *pgnA*, *mela* bzw. *avpA* mit homologen Sequenzbereichen. A) *gpdA*-Promotor; B) 1: DNA-Größenstandard; 2) *pgnA*; 3) *mela* 4) *avpA*

4.1.2. Expression der NRPS-ähnlichen Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.2.1. Einleitung

Da die Expression der NRPS-ähnlichen Gene mit dem eigenen Promotor und Terminator in *A. nidulans* nicht erfolgreich war, sollten parallel zur heterologen Expression in *A. nidulans* versucht werden die NRPS-ähnlichen Gene *apvA*, *btyA*, *pgnA*, *mela* und *atr_{At}* aus *A. terreus* in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) zu exprimieren. Dabei ist zu beachten, dass die NRPS-ähnlichen Proteine nach der Synthese in der *apo*-Form vorliegen und zunächst posttranslational mit einem Ppant-Arm modifiziert werden müssen (s. Kapitel 1.2.3). In dem *S. cerevisiae* Stamm BJ5464_NpgA wurde das Gen für die PPTase *npgA* aus *A. nidulans* ins Genom integriert (Tabelle 3-6) (Lee et al. 2009). Überdies sind die beiden Gene ausgeschaltet, die für die Protease Pep4 und Prb1 kodieren, da sie für den Abbau von Proteinen verantwortlich sind und die heterologen Proteine abbauen würden (Kerstens and Van 2018). Schon bei Studien an Polyketiden aus Pilzen hat sich BJ5464_NpgA als gutes Werkzeug für die Untersuchung pilzlicher Enzyme erwiesen (Bond et al. 2016). Aufgrund von möglichen verschiedenen ‚splice‘ Mustern bei der Expression von pilzlichen Gene in *S. cerevisiae* darf die Gensequenz der zu untersuchenden Gene keine Introns enthalten. Die in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen wiesen hingegen für drei der NRPS-ähnlichen Gene eine Intron-Exon-Struktur auf, daher sollte für die Amplifikation cDNA verwendet werden und so der Aufbau der Gene bestätigt werden.

4.1.2.2. Isolierung von mRNA aus *A. terreus* und cDNA Synthese

Die *A. terreus* Stämme DSM1958 und A1156 (stimmt mit dem sequenzierten Stamm NIH 2624 überein) wurden für drei bzw. vier Tage in HME-Flüssigmedium bei 30°C angezogen. Das Mycel wurde abfiltriert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurde das Mycel der beiden Stämme mit Hilfe von flüssigem Stickstoff jeweils zu einem feinen Pulver zermahlen und wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben für die Isolierung der mRNA und die anschließende cDNA Synthese verwendet.

4.1.2.3. Amplifikation und Klonierung von *apvA* und *mela*

Das Gene *apvA* (ATEG_02004) wurde mit Hilfe der Primer 2004_1_fwd und 2004_2_rvs unter den im Kapitel 3.5.13 aufgeführten PCR-Bedingung von allen vorhandenen cDNA Proben vervielfältigt (Abbildung 4-13). Das PCR-Produkt aus der cDNA von dem Stamm A1156 nach 3 Tagen wurde aufgereinigt und in den Vektor pGEM®-T easy ligiert (s. Kapitel 3.5.12). Wie in Abbildung 4-14 zu sehen, bestätigte eine Restriktionshydrolyse mit *PstI* die Insertion des Gens in den Vektor.

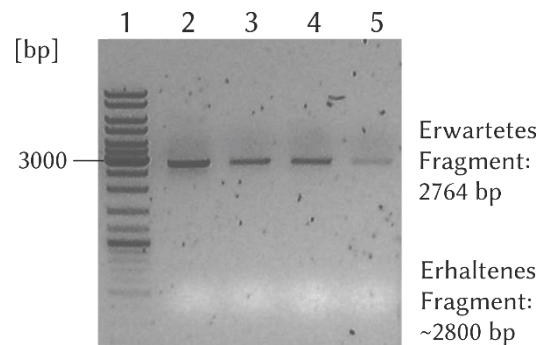


Abbildung 4-13: 1%iges Agarosegel der PCR-Amplifikation von ATEG_02004 aus cDNA. 1) DNA-Größenstandard; 2) Aus A1156 3 Tage 3) Aus A1156 4 Tage; 4) Aus DSM1958 3 Tage; 5) aus DSM1958 4 Tage

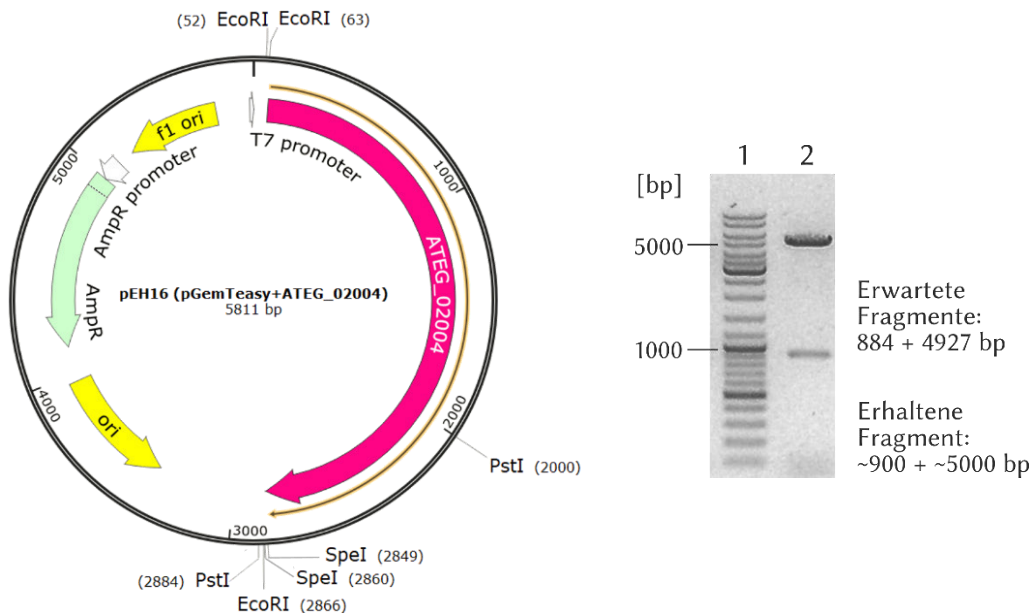


Abbildung 4-14: Vektorkarte von pEH16 (ATEG_02004 in pGemT® easy) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. *EcoRI* und *SpeI* wurden zur Umklonierung verwendet. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH16 mit *PstI* verdaut.

Die anschließenden Sequenzanalysen für das *apvA* Konstrukt zeigten, dass das in der Datenbank von NCBI vorhergesagte Intron von 31 bp weiter mit abgelesen wurde. Obwohl es sehr unwahrscheinlich ist, ist es möglich, dass trotz der DNA-Hydrolyse vor der cDNA-Synthese noch geringe Spuren an gDNA in der für die PCR verwendeten Lösung vorhanden waren. Da es kaum möglich ist, dass mehrere Proben noch gDNA enthalten, wurde auch das PCR-Produkt von der cDNA, welche von dem Stamm A1156 nach 4 Tagen gewonnen wurde, aufgereinigt und in den Vektor pGEM®-T easy ligiert. Auch das so erhaltene Plasmid wies noch das vermeintliche Intron auf, daher wurde die erhaltene Sequenz als korrekt angesehen.

und genauer analysiert. In der Gensequenz der beiden Konstrukten fehlte im Vergleich mit der in der NCBI Datenbank hinterlegten Sequenz ein Guanin an der Position 1957, welche in dem vorhergesagten Intron lag. Durch diese fehlende Base kommt es in der Sequenz zu einer Leserasterverschiebung zu -1. Diese entspricht der Verschiebung, die durch das Heraussplices des Introns entstanden wäre. Da in beiden Konstrukten die gleichen Mutationen des Gens nachgewiesen wurden, konnte von einer korrekten Klonierung des Gens ausgegangen werden und das Konstrukt wurde als pEH16 bezeichnet (Abbildung 4-14). Informationen zu der ursprünglichen und hier identifizierten Sequenz ist in Tabelle 7-1 im Anhang einzusehen.

Die Amplifikation von *mela* (ATEG_03563) wurde unter den in Punkt 3.5.13 genannten PCR-Bedingungen mit den Primern 3563_1_fwd und 3563_2_rvs durchgeführt. Das Amplifikat (s. Abbildung 4-15) wurde in den pGemT®-easy Vektor ligiert und die Sequenz analysiert. Auch für *mela* wurde in der in NCBI hinterlegten Sequenz zwei Introns vorhergesagt, die in der aus cDNA amplifizierten Sequenz nicht entfernt worden waren. Die Sequenzanalysen offenbarten eine Deletion in einem der vorhergesagten Introns, wodurch auch bei diesem Gen das Leseraster in den Rahmen -

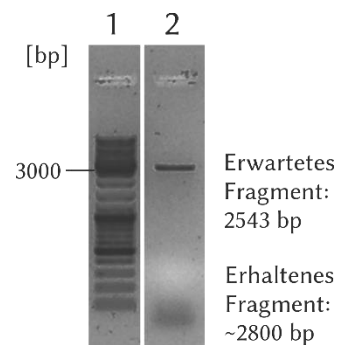


Abbildung 4-15: 1%iges Agarosegel der PCR-Amplifikation von ATEG_03563 aus cDNA. 1) DNA-Größenstandard; 2) *mela*

1 verschoben wurde. Diese Verschiebung des Leserasters wäre auch durch das *splicen* des zweiten Introns entstanden. Außerdem wurde eine stille Mutation von einem Thymin zu einem Cytosin beobachtet. Die Sequenz von ATEG_03563 hat nun 288 bp mehr als in der NCBI-Datenbank vorhergesagt wurde und hat eine Länge ApvA 925 AS (Tabelle 7-1). Das pGemTeasy-Konstrukt wurde als pEH19 bezeichnet.

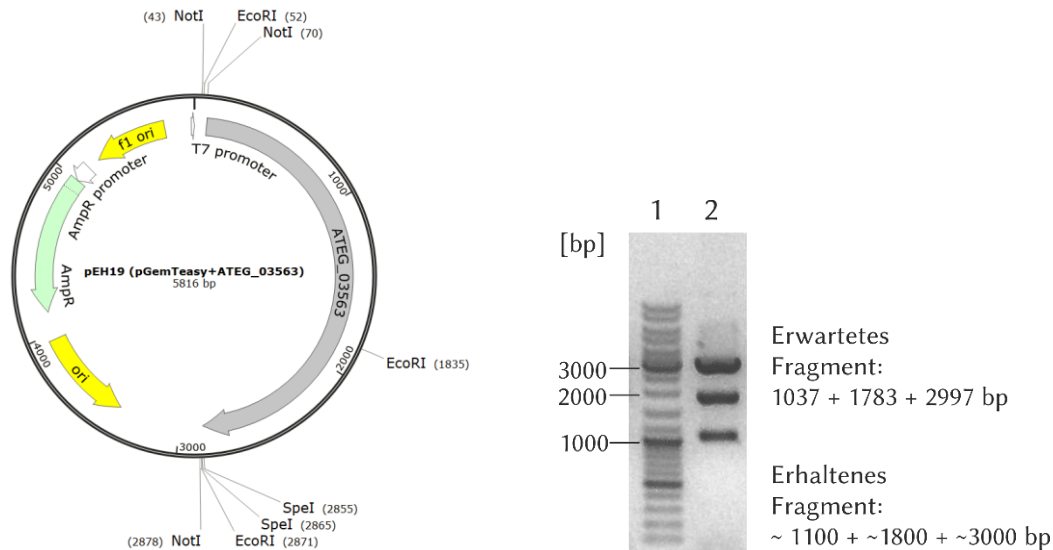


Abbildung 4-16: Vektorkarte von pEH19 (ATEG_03563 in pGemT® easy) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. *NotI* und *SpeI* wurden zur Umklonierung verwendet. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH19 mit *EcoRI* verdaut.

Die beiden Gene wurden im Anschluss an die Verifizierung ihrer Sequenzen in den pESC-URA-Vektor überführt. Dafür wurden pEH16 mit *NotI* und *SpeI* und pEH19 mit *EcoRI* und *SpeI* verdaut und der pGemT® easy Vektor zusätzlich mit *DraI* zerschnitten. Die Gene und der mit den benötigten Restriktionsenzymen verdaute pESC-URA Vektor wurden aufgereinigt und nach dem Protokoll unter Punkt 3.5.12 ligiert. Die fertigen Konstrukte tragen die Bezeichnungen pEH10 und pEH13 und können für die Expression in *S. cerevisiae* verwendet werden.

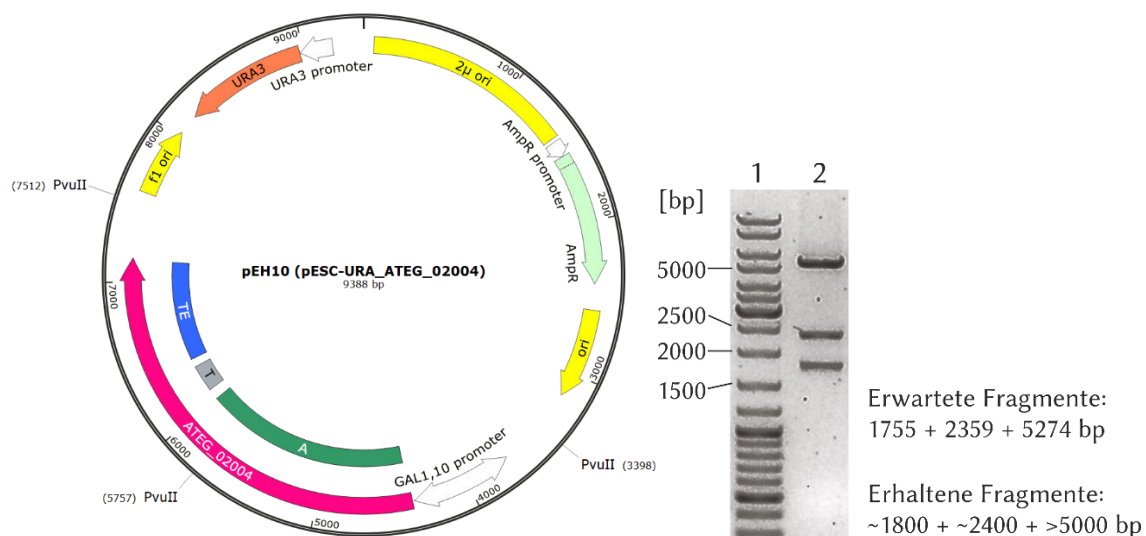


Abbildung 12: Vektorkarte von pEH10 (ATEG_02004 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. *EcoRI* und *SpeI* wurden zur Umklonierung verwendet. *PvuII* diente zur Restriktionskontrolle. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH10 mit *PvuII* verdaut.

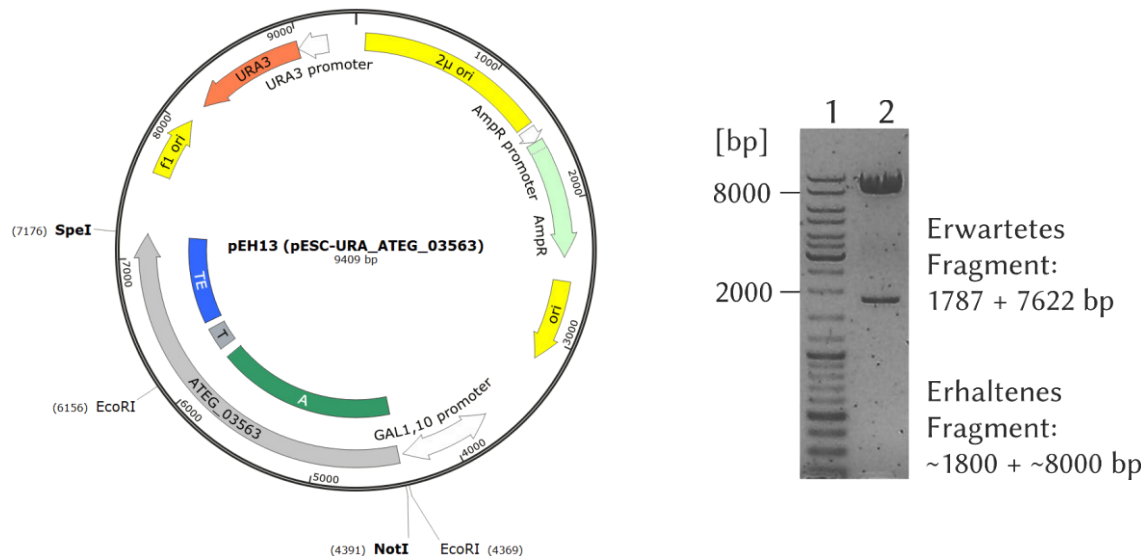


Abbildung 4-17: Vektorkarte von pEH13 (ATEG_03563 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. *NotI* und *SpeI* wurden zur Umklonierung verwendet. *EcoRI* diente zur Restriktionskontrolle. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH13 mit *EcoRI* verdaut.

4.1.2.4. Amplifikation und Klonierung von *pgnA*

Die Amplifikation von *pgnA* (ATEG_08899) erfolgte unter Zuhilfenahme der Primer 8899_4_for und 8899_6_rvs bei den unter Kapitel 3.5.13 aufgeführten PCR-Bedingungen. Die PCR-Fragmente wurden durch homologe Rekombination in *E. coli* (Kapitel 3.5.14) in den geöffneten pESC-URA Vektor eingebracht. Ein Restriktionsverdau mit *PvuII* bestätigte die korrekte Insertion des Gens in den Vektor. Die durch die Sequenzierung identifizierten Mutationen sind in Tabelle 7-1 im Anhang einzusehen. Auch für die Sequenz von *pgnA* wurden verschiedene Klone aus unterschiedlichen PCR-Ansätzen getestet, um sicherzugehen, dass die Mutationen in der Gensequenz vorhanden waren und nicht aus einer fehlerhaften PCR-Amplifikation resultierten.

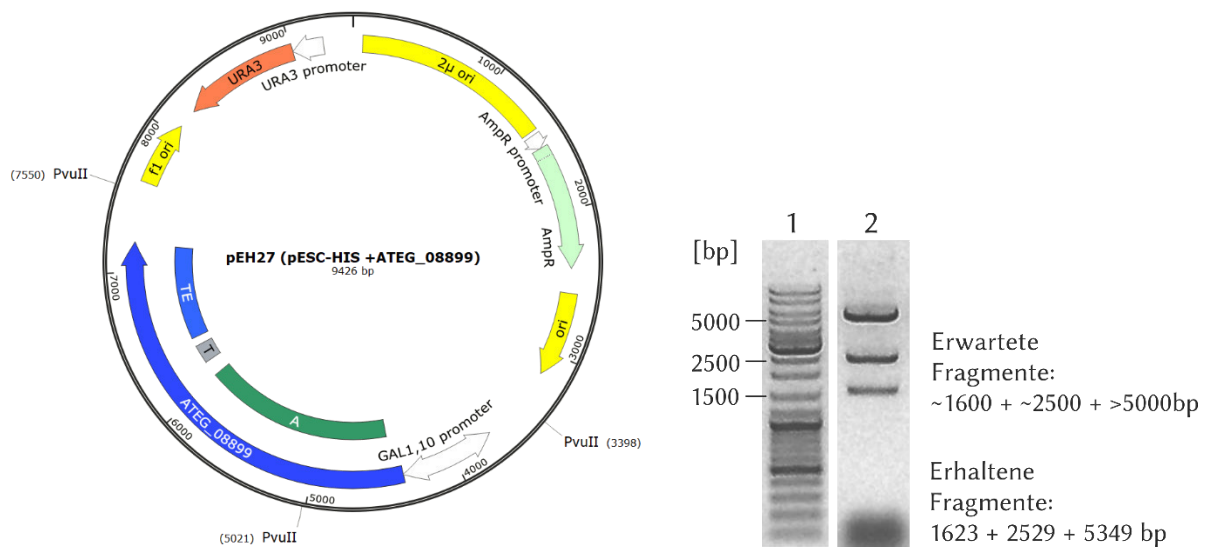


Abbildung 4-18: Vektorkarte von pEH27 (ATEG_08899 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH27 mit PvuII verdaut.

4.1.2.5. Amplifikation und Klonierung von *btyA*

Das Gen *btyA* (ATEG_02815) konnte mit den Primern 2815_1_fwd und 2815_rvs nicht von der cDNA amplifiziert werden. Die Amplifikation wurde erfolglos mit der Taq-Polymerase, HIFI Polymerase und Phusion Polymerase und diversen PCR-Bedingungen (Gradienten-PCR mit 50-65) durchgeführt. Auch die Verwendung von GC-Puffer bei den PCR-Ansätzen mit der Phusion bzw. Puffer 3 bei den PCR-Ansätzen mit der HIFI-Polymerase und zusätzlicher Zugabe von DMSO führte nicht zu dem gewünschten Produkt. Eine Grund für die ergebnislose PCR ist, dass unter den Kultivierungsbedingungen das Gen in *A. terreus* nicht transkribiert wurde.

Angesichts der in den Sequenzen der anderen NRPS-ähnlichen Genen gefundenen Mutationen, verglichen mit den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen, wurde jedoch eine fehlerhafte Vorhersage des Genbereichs von ATEG_02815 vermutet. In der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz besteht der C-Terminus von *btyA* aus einem zweiten, 27 bp langen Exon. Ein Ablesen des Gens ohne das zweite Exon mit einem alternativen Stopkodon würde einen Unterschied von lediglich acht AS in der Proteinsequenz bedeuten. Ein Vergleich der C-Termini von bekannten NRPS-ähnlichen Enzymen aus Ascomyceten und Basidiomyceten zeigt außerdem, dass die C-Termini eine konsistente Länge aufweisen mit dem der alternative C-Terminus von *btyA* kongruent ist (Abbildung 7-1). Daher wurde der Primer 2815_2_rvs designet, mit welchem das Intron und das zweite Exon nicht abgelesen werden. Eine Übersicht der divergierenden Sequenzen ist im Anhang in Tabelle 7-1 einzusehen. Die Amplifikation war mit dem neuen Primer erfolgreich, allerdings ausschließlich mit der HIFI Polymerase von Roche bei einer Temperatur von 56°C. Das PCR-

Amplifikat wurde aufgereinigt und mittels Homologer Rekombination in den geöffneten pESC-URA Vektor inseriert. Die Vektorkarte und das Agarosegel eines Kontrollverbaus mit *PvuII* sind in Abbildung 4-19 zu sehen.

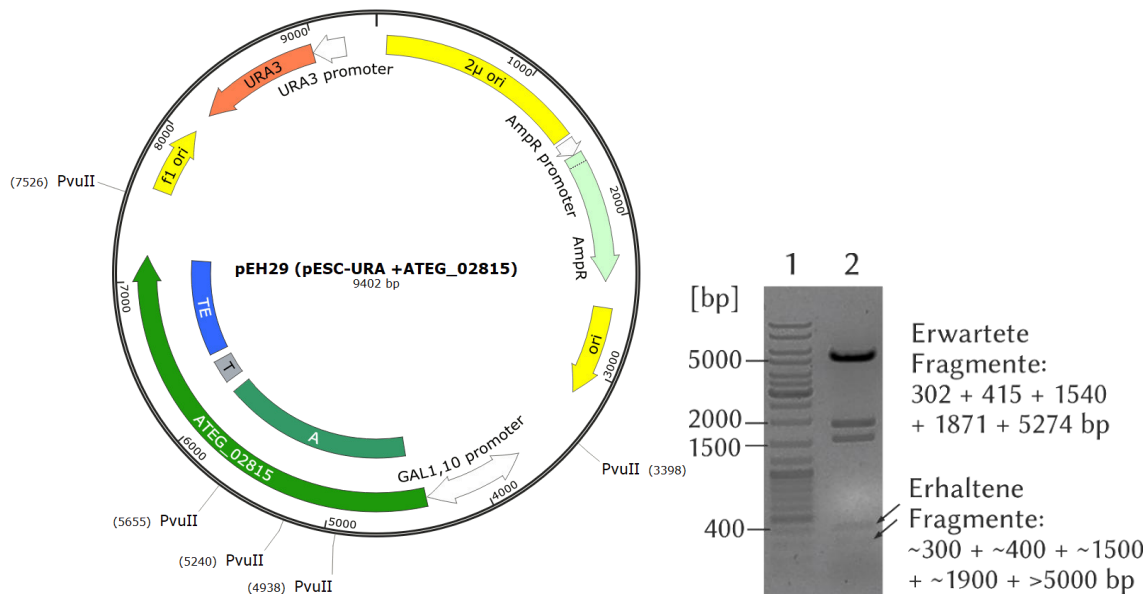


Abbildung 4-19: Vektorkarte von pEH29 (ATEG_02815 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH29 mit *PvuII* verdaut.

4.1.2.6. Amplifikation und Klonierung von *atrA_{At}*

Das putative NRPS-ähnliche Gen *atrA_{At}* (ATEG_03090) bestand nach den Voraussagen aus einer 2535 bp langen Sequenz, die lediglich für eine A-Domäne und eine T-Domäne kodiert. Folglich würde eine für die katalytische Aktivität verantwortliche Domäne, wie eine C-, R- oder TE-Domäne fehlen. Da in dem näheren genetischen Umfeld eine Reihe von Genen zu finden sind, die einem Sekundärmetabolit-Cluster entsprechen, sollte ATEG_03090 als Kandidat für ein ungewöhnliches NRPS-ähnliches Enzym untersucht werden.

Die 2535 bp umfassende Sequenz wurde mit den Primern 3090_1_fwd und 3090_2_rvs amplifiziert und in den pGemT® easy Vektor eingebracht. Wie bei einigen der anderen NRPS-ähnlichen Gene wurde auch in dieser Gensequenz im Vergleich mit der NCBI-Sequenz eine Deletion identifiziert, die eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge hat. Um die korrekte Länge des Genes zu identifizieren wurde das Konstrukt pCaW6, welches den *downstream* Bereich von ATEG_03090 enthält, mit dem Primer 3090_wA_do sequenziert. Die revidierte Gensequenz wurde mit dem Primerpaar 3090_6_for und 3090_3_rvs amplifiziert. Die Sequenzierung bestätigte die Gensequenz und das Konstrukt wurde als pEH55 bezeichnet. In Abbildung 4-20 ist neben der Vektorkarte die Restriktionshydrolyse der Plasmid-DNA mit *EcoRI* zu sehen. Die korrigierte Gensequenz ist 2763 bp lang und kodiert für ein aus 920 Aminosäuren bestehendes Protein, welches eine A-T-TE Architektur aufweist (Tabelle 7-1).

BLAST-Analysen der Proteinsequenz wiesen die höchsten Identitäten für ApvA aus *A. terreus* mit einer Übereinstimmung von 57 % auf der Aminosäureebene auf (Tabelle 7-2).

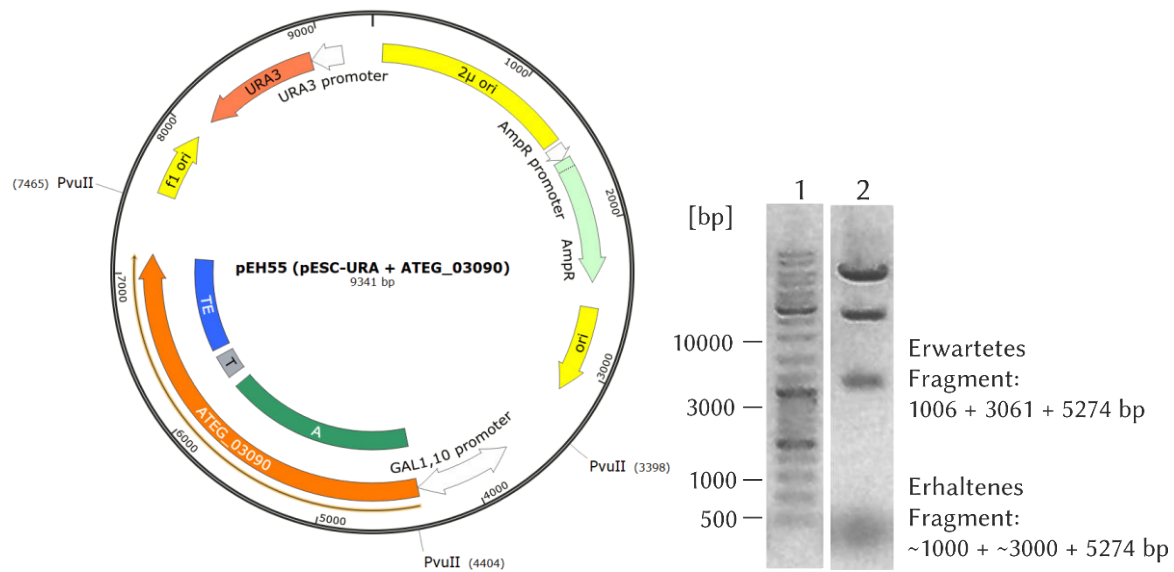


Abbildung 4-20: Vektorkarte von pEH55 (ATEG_03090 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH55 mit PvuII verdaut.

Für die Expression in der Bäckerhefe stehen somit fünf Konstrukte (pEH10, pEH13, pEH27, pEH29 und pEH55) auf der Basis des pESC-URA Vektors zur Verfügung, die unter der Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren Promotor Gal1 stehen.

4.1.2.7. Transformation und Fermentation von *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA

Die Plasmide pEH10, pEH13, pEH27, pEH29 und pEH55 sowie der pESC-URA Vektor wurden in den *S. cerevisiae* Stamm BJ5464_NpgA transformiert (Kapitel 3.5.6). In einem Kulturröhrchen mit 5 ml SC-Medium und 2 % Glucose als Kohlenstoffquelle wurden die Kolonien angeimpft und für mindestens 24 Std. kultiviert. Die Expression erfolgte in einem 50 ml-Ansatz in dem SC-URA-Medium mit 2 % Galaktose als Kohlenstoffquelle mit der Vorkultur auf eine Absorption von 0,1 bei einer Wellenlänge von 600 nm angeimpft wurde.

Nach 24 Stunden war in den Kulturen, die das ApvA produzieren, eine gelbe Färbung der Kultur zu beobachten. Nach einer Kultivierung von 48 Std. wurden die Ansätze im Scheidetrichter dreimal mit 1:1 Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen der drei Extraktionen wurden vereinigt und bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde das Pellet in Methanol rückgelöst und an der LCMS vermessen. Im Vergleich mit der negativ Kontrolle sind in den UV-Chromatogrammen bei 296 nm von den pEH10, pEH27, bzw. pEH29 tragenden Transformanten neue, dominante Signale zu erkennen (Abbildung 4-21 B, D und E).

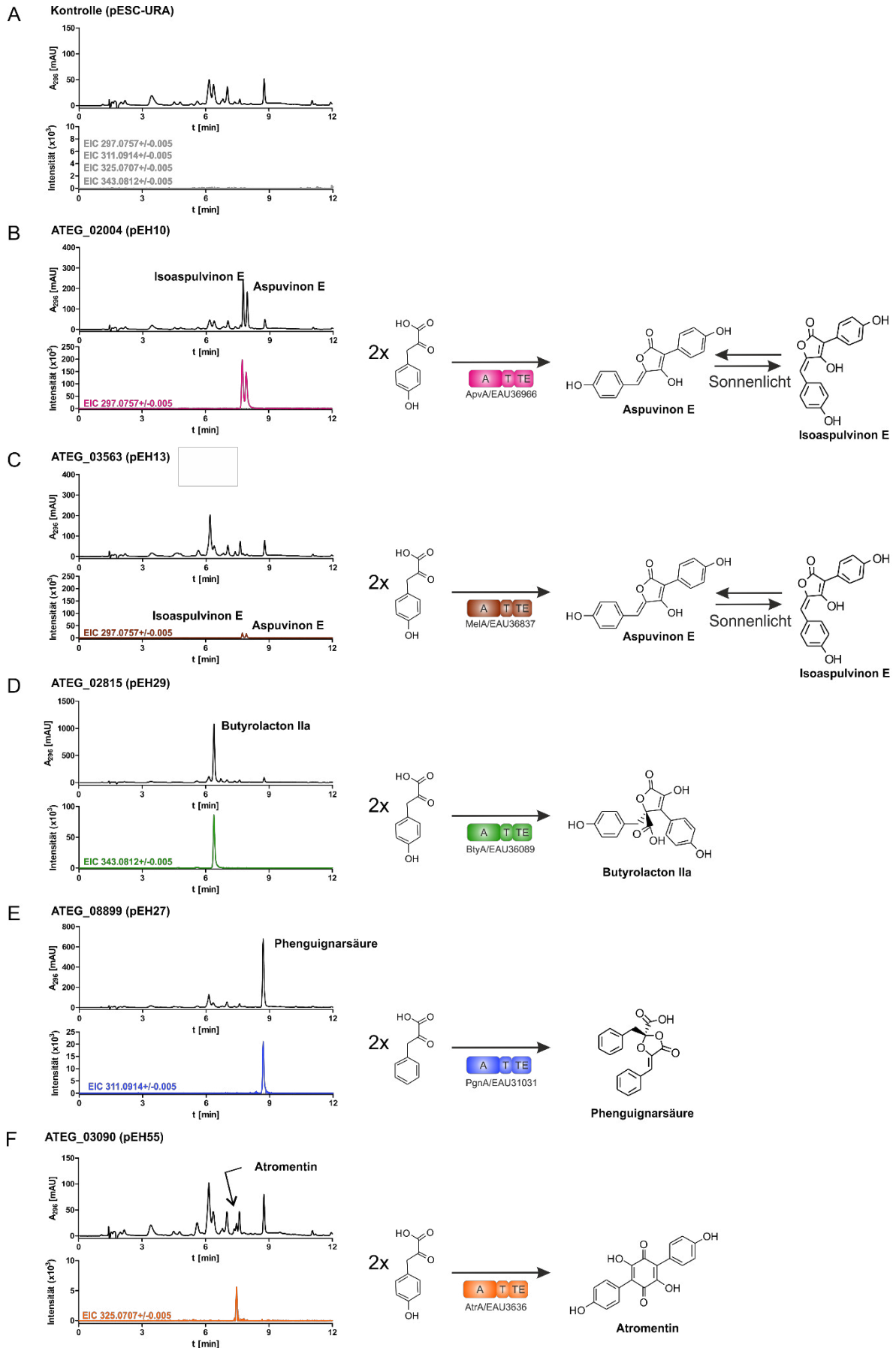


Abbildung 4-21: LC-MS Analyse der Ethylacetatextrakte von NRPS-ähnlichen Genen exprimierenden *S. cerevisiae* BJ5454 *NpgA* Kulturen 48 Stunden nach der Induktion. Die UV-Spektren von 296 nm sind in schwarz und die zu den Produkten gehörigen Chromatogramme der $[M + H]^+$ Ionen sind in Farbe abgebildet.

In den Chromatogrammen der *atrA_{At}* exprimierenden Kultur wurde bei einer Absorption von 296 nm ein zusätzlicher Peak nach 7,5 min beobachtet (Abbildung 4-21 F). Die detektierten $[M + H]^+$ -Ionen von $m/z = 325.0707$ entsprachen nicht der Masse von Aspulvinon E, wie angesichts der Homologie von 57 % zu ApvA vermutet worden war. Der Vergleich der theoretischen $[M + H]^+$ -Ionen aller bekannten Produkte von NRPS-ähnlichen Enzymen, offenbarte eine Übereinstimmung mit den theoretischen $[M + H]^+$ -Ionen von $m/z = 325.0719$ für Atromentin.

Für die Quantifikation der Produktion durch die NRPS-ähnlichen Enzyme von ApvA, BtyA, PgnA und *AtrA_{At}* wurden die Transformanten in SC-URA Medium bei 30 °C kultiviert (*apvA* tragende Kulturen wurden im Dunkeln inkubiert) und zu definierten Zeitpunkten Proben gezogen. Die Produktbildung wurde anhand der Peakflächen bei 296 nm im Vergleich mit einem authentischen Standard berechnet. In allen Kulturen stieg die Bildung der Substanzen von 15-28 Std. exponentiell an und stagnierte fast völlig nach 40 Stunden (Abbildung 4-22). Für Aspulvinon E wurde eine Ausbeute von 13 mg/l, für Penguignarsäure 15 mg/l, für Atromentin 3,2 mg/l und für Butyrolacton IIa sogar eine Produktion von 35 mg/l Kultur nach 100 Std. Kultivierung berechnet.

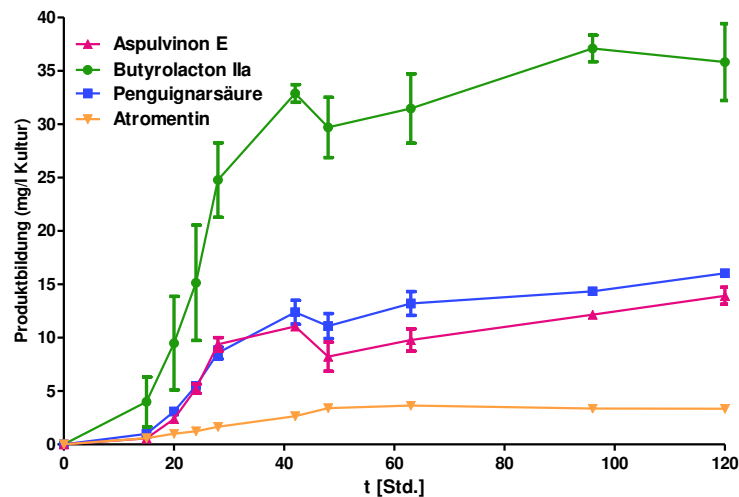


Abbildung 4-22: Produktbildung in den *S. cerevisiae* Transformaten. Die Daten wurden von drei unabhängigen Kultivierungen gewonnen. Ein authentischer Standard wurde für die Quantifikation mit einem Dioden-Array bei 296 nm verwendet.

4.1.2.8. Isomerisierung von Aspulvinon E

In dem Sekundärmetabolit Profil von der Kultur, die *apvA* exprimiert, wurden anstatt eines Produktpeaks zwei Peaks mit identischen $[M + H]^+$ von $m/z = 297.076$ beobachtet. Da sich die Kultur außerdem gelb verfärbte, wurde vermutet, dass es sich bei dem Produkt von ApvA um Aspulvinon E handelt, welches photosensitiv ist und sich unter Licht-Einfluss in das Isomer Isoaspulvinon E umwandelt (Gao et al 2013). Um diesen Sachverhalt zu überprüfen wurde die Kultur mit pEH10 für 48 Std. im Dunkeln kultiviert. Anschließend wurde die Kultur mit Ethylacetat ausgeschüttelt, eingengt und in Methanol rückgelöst. Des Weiteren wurde diese für zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert, um auszuschließen, dass das Produkt thermolabil ist und die Konformations-isomerie durch Hitze bedingt ist. Es wurde keine Umwandlung von Aspulvinon E beobachtet (Abbildung 4-23).

Die Anwendung der langen LC-MS Methode gewährleistete eine deutlichere

Trennung der beiden Produktpeaks. In der so erworbenen Probe wurde nur ein Peak mit der Retentionszeit von Aspulvinon E detektiert (Abbildung 4-23 A). Daraufhin wurde die Probe bei Raumtemperatur für unterschiedliche Zeiten belichtet und die Veränderungen mittels LCMS detektiert. Schon nach 30 min Belichtungszeit konnte die Isomerisierung von Aspulvinon E zu Isoaspulvinon E beobachtet werden (Abbildung 4-23 B). Mit steigender Belichtungszeit wurde immer mehr Aspulvinon E umgewandelt, bis nach 4 Std. etwa ein Gleichgewicht zwischen den Isomeren erreicht wurde.

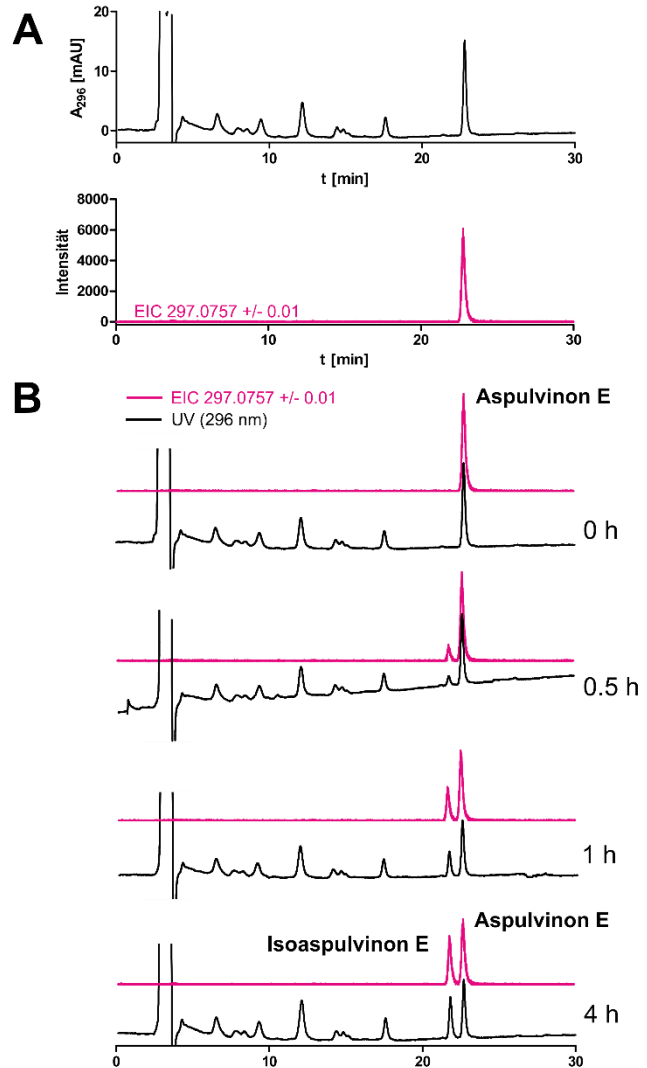


Abbildung 4-23: Zeitabhängige Umwandlung von Aspulvinon E zu Isoaspulvinon E unter Belichtung. A) LC-MS Analyse des Ethylacetat-extraktes der pEH10 tragenden Kultur im Dunkeln angezogen. B) Analytik der Umwandlung im Extrakt nach verschiedenen Belichtungsauern

4.1.2.9. Strukturaufklärung der Produkte

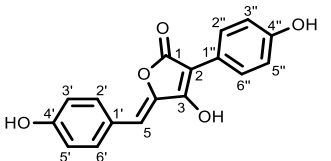
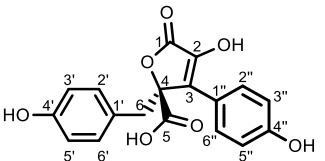
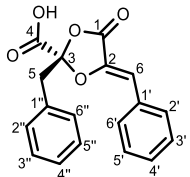
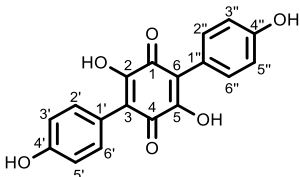
Zur Strukturaufklärung wurden 2 l SC-URA Medium mit 2% Galaktose mit den pEH10, pEH28, pEH29 bzw. pEH55 tragenden *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA Zellen inokuliert. Nach einer Kultivierung bei 30 °C für 48 Std. wurden die Sekundärmetabolite dreimal mit 1:1 Volumen Ethylacetat extrahiert und bis zur Trockene eingeeengt. Anschließend wurden die Pellets in Methanol gelöst und die enzymatischen Produkte mit Hilfe der HPLC isoliert. Wie bereits in Kapitel 4.1.2.8 erläutert, wurde aufgrund der gelben Farbe und der Lichtsensitivität von der durch ApvA synthetisierten Substanzen die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei dem akkumulierten Produkt um Aspulvinon E handeln könnte. Daher wurde die zugehörige Kultur unter Lichtausschluss kultiviert und auch alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

Von den isolierten Substanzen aus den ApvA, BtyA, AtrA_{At} und PgnA produzierenden Transformanten wurden ¹H-NMR-Spektren aufgenommen. Die ¹H-NMR Spektren sind im Anhang hinterlegt (Abbildung 7-4 - Abbildung 7-7). Als Referenz diente das Signal des verwendeten Lösungsmittels. Die in Tabelle 4-3 zusammengestellten Daten der Produkte stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Angaben für die entsprechenden Substanzen überein (Gao et al. 2013b; Sun et al. 2016; van Dijk et al. 2016; Wackler et al. 2012). Da auch die an der LC-MS detektierten Massen zu den theoretischen [M + H]⁺-Ionen der Produkte passen, konnten die Produkte eindeutig identifiziert werden. Da das von Mela synthetisierte Produkt die gleiche Retentionszeit, UV-Spektrum, photosensitive Eigenschaften und theoretische [M + H]⁺ von m/z = 297.0757 hatte, wurde auch das Produkt von Mela eindeutig als Aspulvinon E identifiziert.

Tabelle 4-2: LC-HR-ESI-MS Daten der isolierten Produkte

Substanz	Summen-Formel	LC-HR-ESI-MS Daten [M + H] ⁺		Abweichung (ppm)
		berechnet	gemessen	
Aspulvinon E	C ₁₈ H ₁₂ O ₅	297.0757	297.0757	0.0
Butyrolacton IIa	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	343.0812	343.0813	-0.3
Phenguignarsäure	C ₁₈ H ₁₅ O ₅	311.0914	311.0910	1.3
Atromentin	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	325.0707	325.0719	-3.7

Tabelle 4-3: ¹H-NMR-Daten der Produkte von ApvA, BtyA, PgnA und Atr_{At}

	Aspulinon E	Butyrolacton IIa	Phenguignarsäure	Atromentin
				
Lsg-mittel	((CD ₃) ₂ CO)	δ _H , multi; <i>J</i> in Hz; ((CD ₃) ₂ SO)	δ _H , multi <i>J</i> in Hz; (CDCl ₃)	δ _H , multi; <i>J</i> in Hz; ((CD ₃) ₂ SO)
Position	δ _H , multi; <i>J</i> in Hz;			
2		10.38, s (OH) ^a		10.76, s (OH)
5	6.62, s		3.55, d, 14.7 3.54, d, 14.7	10.76, s (OH)
6		3.36, s	6.25, s	
2'	7.68, d, 8.8	6.59, d, 8.6	7.63, m	7.21, d, 8.7
3'	6.88, d, 8.8	6.50, d, 8.6	7.40, m	6.78, d, 8.7
4'		9.87, s (OH) ^a	7.34, m	9.49, s (OH)
5'	6.88, d, 8.8	6.50, d, 8.6	7.40, m	6.78, d, 8.7
6'	7.68, d, 8.8	6.59, d, 8.6	7.63, m	7.21, d, 8.7
2''	7.90, d, 8.7	7.60, d, 8.8	7.29, m	7.21, d, 8.7
3''	6.91, d, 8.7	6.87, d, 8.8	7.23, m*	6.78, d, 8.7
4''		9.16, s (OH) ^a	7.23, m*	9.49, s (OH)
5''	6.91, d, 8.7	6.87, d, 8.8	7.23, m*	6.78, d, 8.7
6''	7.90, d, 8.7	7.60, d, 8.8	7.29, m	7.21, d, 8.7

* Die Signal überlappen mit denen des Lösungsmittels

^a: Die Zuordnungen mit den gleichen Buchstaben sind austauschbar

Die Daten stimmen mit denen aus der Literatur für Aspulinon E (Gao et al. 2013a), Butyrolacton IIa (van Dijk et al. 2016), Phenguignarsäure (Sun et al. 2016) und Atromentin (Wackler et al. 2012) überein.

4.1.3. Untersuchungen zu Indolpyruvat aktivierenden putativen NRPS-ähnlichen Enzymen aus *Aspergillus terreus* und *Chaetomium globosum*

4.1.3.1. Einleitung

Vertreter von der als Asterrichinone bezeichneten Gruppe von Naturstoffen konnten bisher ausschließlich aus Ascomyceten isoliert werden. Aus verschiedenen *Chaetomium* Spezies wurden beispielsweise die Cochliodinole isoliert und auch in der Gattung *Aspergillus* konnten eine Reihe von Asterrichinonen nachgewiesen werden (Abdel-Azeem 2020; Arai et al. 1981). Für alle Sekundärmetabolite dieser Gruppe bildet das Didemethylasterrichinone D (DDAQ D) das Grundgerüst, welches im Anschluss durch Prenylierungen oder Methylierungen modifiziert werden kann. Es stellt somit einen universellen Vorläufer dar und ist eindeutig in den Molekülen dieser Gruppe zu erkennen (Abbildung 4-24).

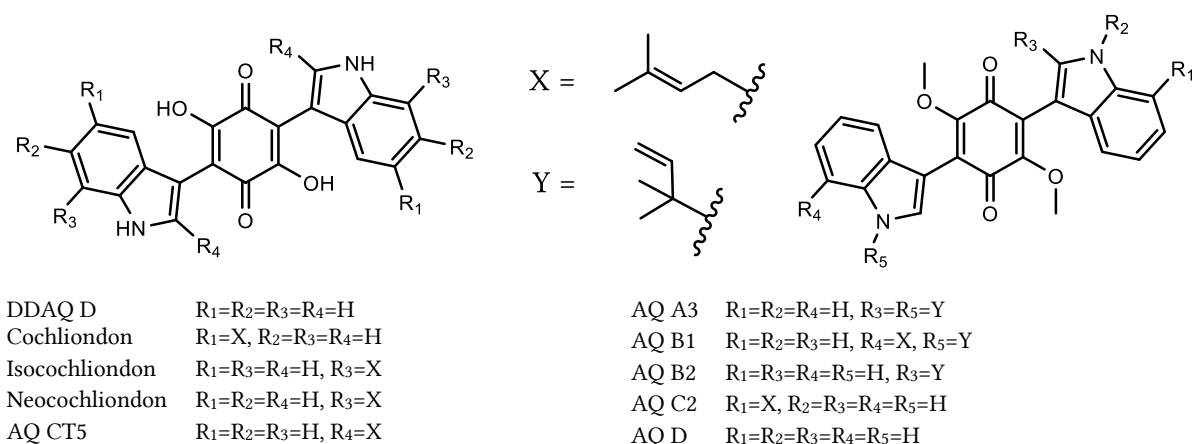


Abbildung 4-24: Beispiele einiger Strukturen von isolierten Bisindolbenzochinonen aus *C. globosum* und *A. terreus*

Schon 1990 vermuteten Arai und Yamamoto, dass DDAQ D durch die Kondensation von zwei Molekülen Indol-3-Pyruvat gebildet wird. Anhand des *tdi*-Clusters aus *A. nidulans* konnte die Biosynthese von Terrechinon A aufgeklärt werden (Balibar et al. 2007; Schneider et al. 2007). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das NRPS-ähnliche Enzym TdiA die beiden Indol-3-Pyruvat Moleküle durch Claisen Condensation miteinander verknüpft. Durch Bioinformatische Untersuchungen wurde sowohl in *A. terreus* als auch in *C. globosum* ein fast vollständiges homologes Cluster zu dem *tdi*-Cluster identifiziert. In diesen Clustern sind ATEG_0700 (*atqA*) und CHGG_03687 (*astA*) homolog zu dem NRPS-ähnlichen Gen *tdiA* und weisen auf Aminosäureebene eine 66 %ige Identität zu TdiA auf (Tabelle 7-3). Weiterhin führte in einer Studie von 2013 die Deletion von *atqA* in *A. terreus* zu dem Fehlen der Asterrichinone in den Sekundärmetabolitprofil (Guo et al. 2013a).

4.1.3.2. Amplifikation und Klonierung von *atqA* aus gDNA von *A. terreus*

Die Amplifikation von *atqA* (ATEG_00700) der cDNA war auch unter der Verwendung verschiedener PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur: 50-65 °C), Puffern und Polymerasen (Phusion mit HF bzw. GC-Puffer oder HIFI-Polymerase) sowie der Zugabe von DMSO nicht möglich. Daher wurde der Stamm *A. terreus* A1156 für 3 Tage bei 30 °C in HME-Medium kultiviert und die gDNA isoliert (Kapitel 3.5.1). Das unter zu Hilfenahme der Primer 0700_3_fwd und 0700_2_rvs generierte PCR-Amplifikat von *atqA* wurde durch Homologe Rekombination in *E. coli* in den geöffneten pESC-URA Vektor eingebracht (Kapitel 3.5.14). Eine Restriktionsverdau mit *PvuII* bestätigte die korrekte Insertion des Genes in den Vektor.

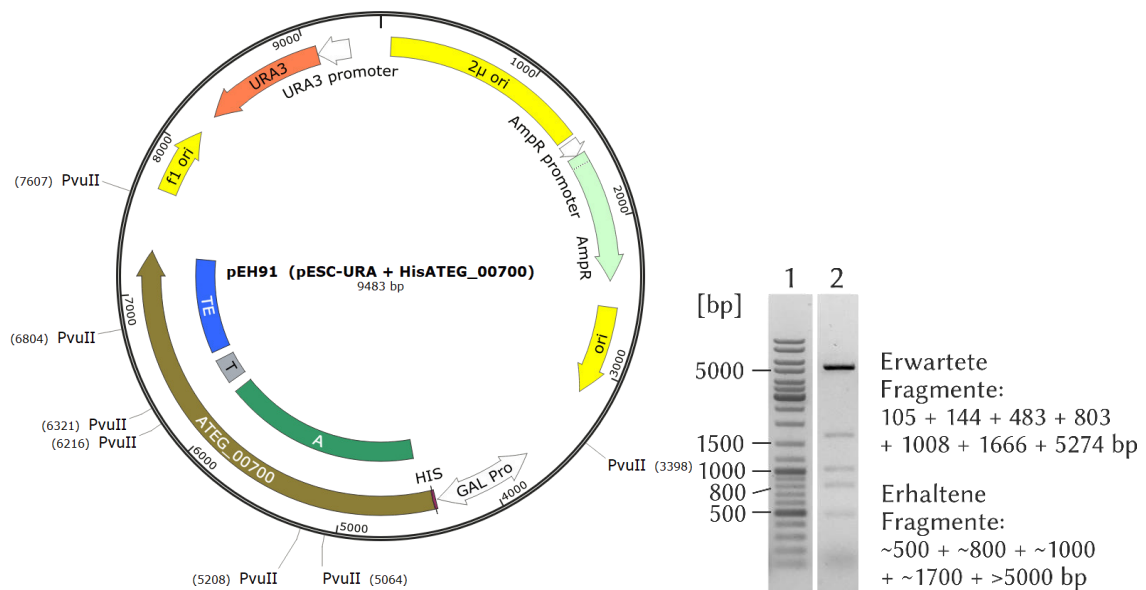


Abbildung 4-25 Vektorkarte von pEH91 (ATEG_00700 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH91 mit *PvuII* verdaut.

4.1.3.3. Amplifikation und Klonierung von *astA* aus gDNA von *Chaetomium globosum*

In der NCBI Datenbank wurde für *astA* (CHGG_03687) aus *Chaetomium globosum* kein Intron vorhergesagt. Da sich auch in den Sequenzen der NRPS-ähnlichen Gene aus *Aspergillus terreus* die prognostizierten Introns als unzutreffend herausgestellt hatten, wurde die Gensequenz von *astA* aus gDNA gewonnen. Die gDNA wurde aus dem *Chaetomium globosum* Stamm NRRL1870 isoliert (Kapitel 3.5.1), welcher dafür 3 Tage in CDH-Flüssigmedium bei 24 °C kultiviert worden war. In der mit dem Primerpaar 3687_3_fwd und 3687_5_rvs amplifizierten und mittels homologer Rekombination in *E. coli* in den pESC-URA klonierten Sequenz, wurden im Vergleich mit der NCBI-Sequenz drei Mutationen (A1333G; C1848T; T1952C) gefunden. Die erste Mutation führt in der Aminosäuresequenz von einem Threonine zu einem Alanin. Die zweite Mutation ist stumm. Die letzte Mutation führt auf

Proteinsequenz zu einem Wechsel von einem Leucin zu Prolin. Das Plasmid bekam die Bezeichnung pEH26 (Abbildung 4-26).

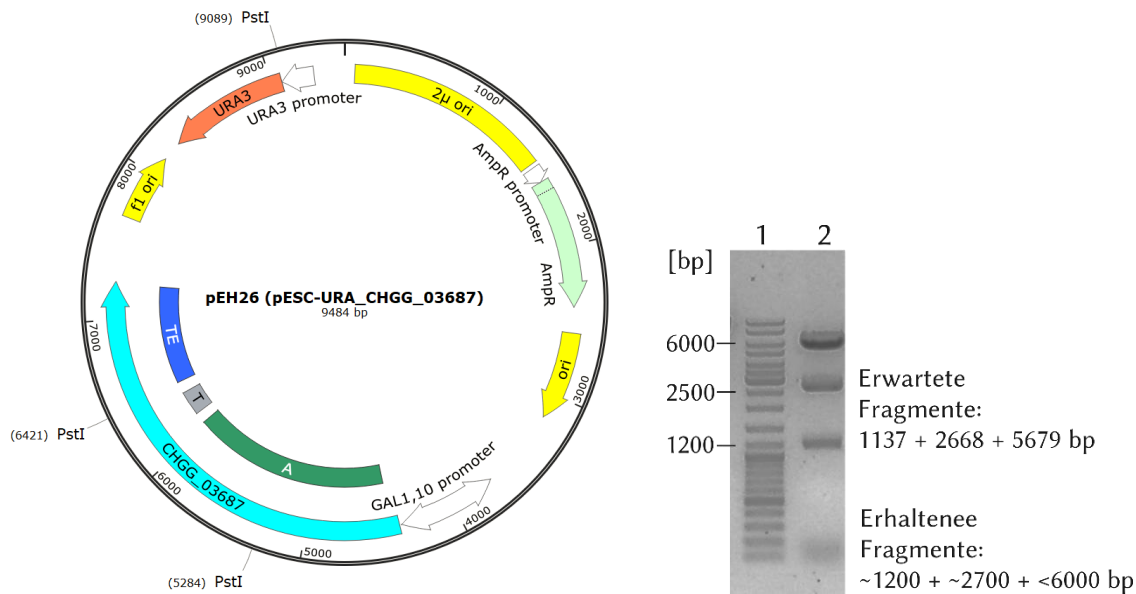


Abbildung 4-26: Vektorkarte von pEH26 (CHGG_03687 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH26 mit PstI verdaut.

4.1.3.4. Biotransformationsversuche von Indolpyruvat in dem *S. cerevisiae* Stamm BJ5464_NpgA bei Zugabe mit AstA

Die Expression von AtqA und AstA konnte nicht in dem Stamm *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA durchgeführt werden, da der Stamm eine Deletion des *trp1* Gens besitzt, dessen Genprodukt wichtige Schritte in der Synthese von Tryptophan katalysiert (vergl. Tabelle 3-6) (Braus et al 1988). Zwar besitzt *S. cerevisiae* mit *trp3* ein homologes Gen, allerdings weist dieses eine deutlich geringere Aktivität auf. Daher liegen in dem BJ5464_NpgA Stamm nur basale Mengen an Tryptophan und folglich auch an dessen erstem Abbauprodukt Indolpyruvat vor. Um den AstA und AtqA in ausreichenden Mengen Indolpyruvat zur Verfügung zu stellen, wurde es bei der Kultivierung dem Medium zugesetzt. Zuerst wurden 500 ml SC-URA-Medium mit 2 % Galaktose mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur des pEH26 bzw. pESC-URA tragenden Hefezellen inokuliert und für 36 Std. bei 230 rpm und 30 °C kultiviert. Die gesamte Kultur wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur und 3000 rpm für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden in 50 ml SC-URA-Medium mit 2 % Galaktose als Kohlenstoffquelle resuspendiert. Anschließend wurde die Kultur in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, Indolpyruvat in einer Endkonzentration von 0,1 mM hinzugefügt und für weitere 48 Std. kultiviert.

Die Analyse der Sekundärmetabolite mittels LC-MS zeigte im Vergleich mit der Negativkontrolle, einen zusätzlichen Peak für die *astA* exprimierenden Kulturen mit einer Retentionszeit von 27,4 min. Die detektierte Masse stimmt mit dem theoretischen $[M + H]^+$ -Ion von $m/z = 371.1026$ überein, daher wurde vermutet, dass das enzymatische Produkt von AstA tatsächlich DDAQ D ist. Der Peaks mit einer Retentionszeit von 17,7 min und $[M + H]^+$ -Ion von $m/z = 162.0918$ ist vermutlich Tryptophol, das erste Abbauprodukt von Indolpyruvat. Tryptophol kann nicht von AstA verwendet werden. Eventuell hat AstA eine zu niedrige Umsatzrate, um größere Mengen DDAQ D herzustellen oder der Zeitpunkt der Zugabe von Indolpyruvat stimmte nicht mit dem höchsten Level der Proteinexpression überein. Eine gestaffelte Zugabe von geringeren Mengen an Indolpyruvat über den Kultivierungszeitraum könnte die Ausbeute an Produkt deutlich steigern. Parallel zu den hier beschriebenen Arbeiten wurde in Zusammenarbeit von Dr. Katja Backhaus, Kristin Öqvist und Johanna Schäfer der Stamm *S. cerevisiae* KO3 hergestellt wurde. Dieser beruht auf KAB26, einem Tryptophan überproduzierenden Hefestamm (Backhaus et al. 2017). Die Deletionen der beiden Peptidasen *prb1* und *pep4* (Kerstens and Van 2018), sowie das Einfügen von *npgA* in den *prb1* Locus gestatten schließlich die Expression der NRPS-ähnlichen Gene in KO3.

4.1.3.5. Produktakkumulation in dem *S. cerevisiae* Stamm KO3 mit AstA und AtqA

Parallel zu der Biotransformation von den anderen NRPS-ähnlichen Genen wurden AstA und AtqA in *S. cerevisiae* KO3 transformiert, die Klone kultiviert und die mit Ethylacetat ausgeschüttelten Die Sekundärmetabolitprofile der Ethylacetatphasen wurden schließlich

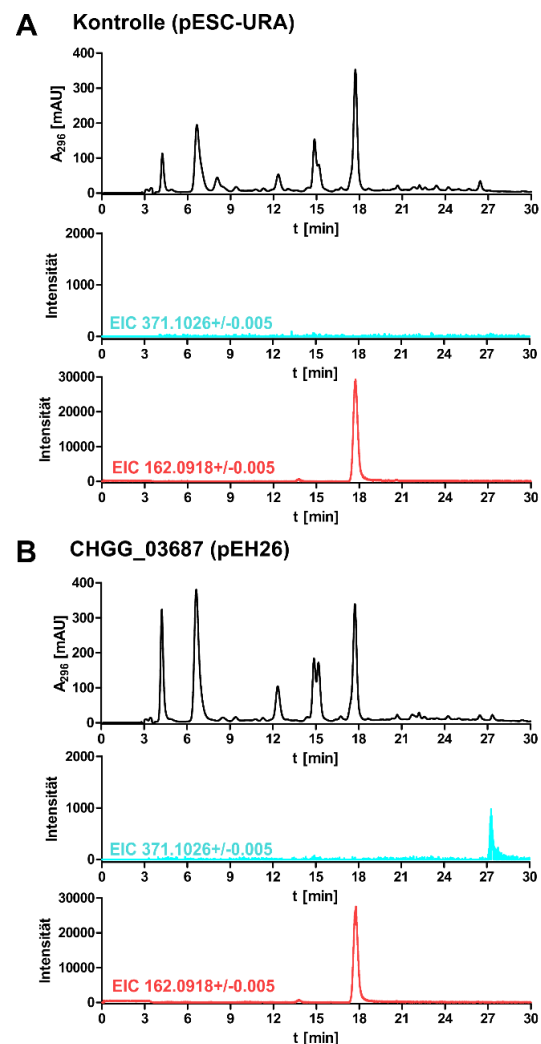


Abbildung 4-27: LC-MS Chromatogramm der Biotransformation von Indolpyruvat in *astA* exprimierenden *S. cerevisiae* Kulturen. Die UV-Spektren von 296 nm sind in schwarz und die Chromatogramme der $[M + H]^+$ Ionen von DDAQ D (hellblau) und Tryptophol (rot) sind in Farbe abgebildet.

mittels LC-MS analysiert. Der Vergleich der Profile von den Kulturen, die den pESC-URA Vektor tragen, mit den pEH54 bzw. pEH91 tragenden Kulturen, zeigt bei einer Retentionszeit von 9,0 min ein Schulter an dem vorhergehenden Peak. Das zugehörige $[M + H]^+$ -Ion von $m/z = 371.1026$ entspricht der theoretisch berechneten Masse.

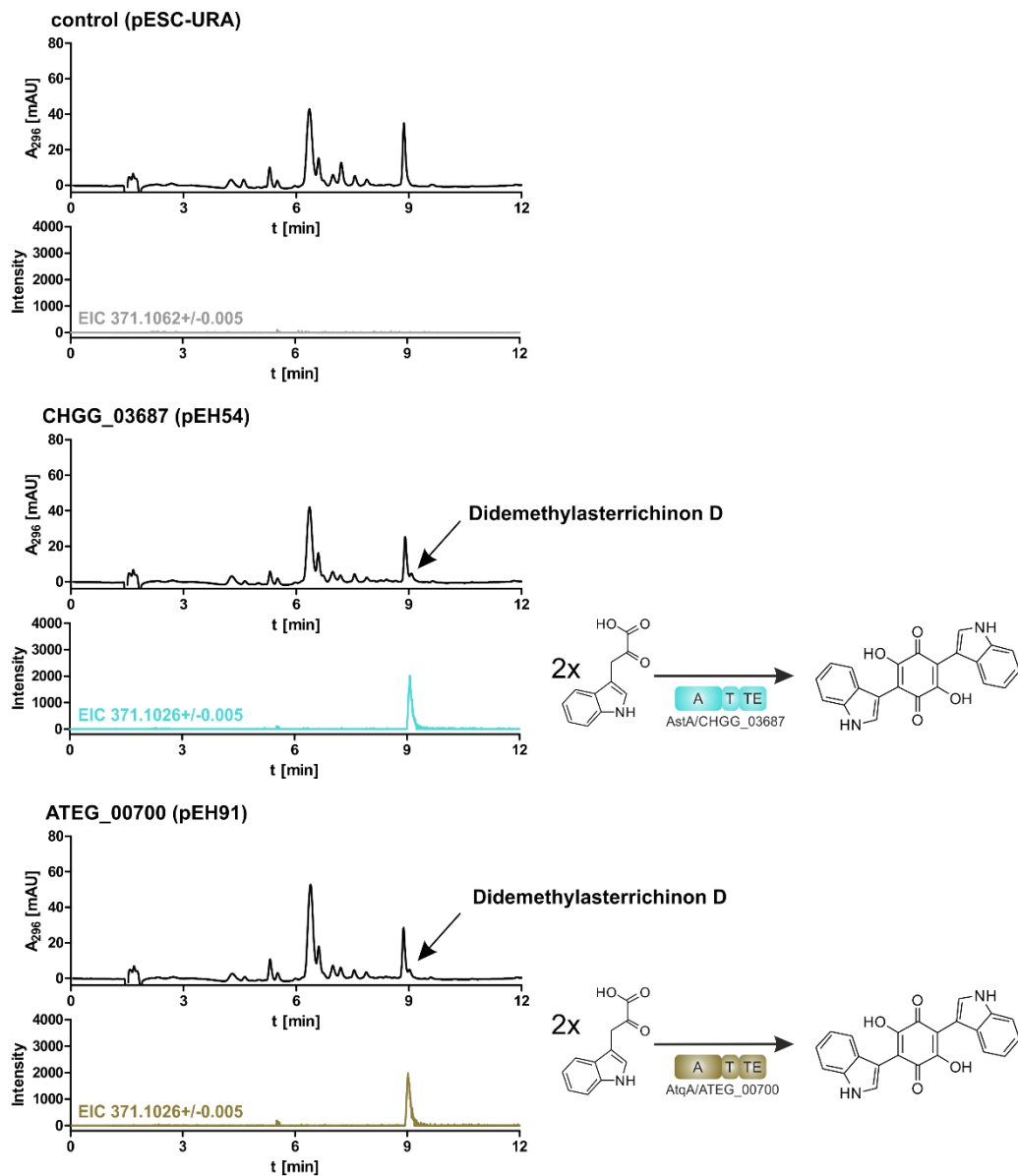


Abbildung 4-28: LC-MS Analyse der Kulturextrakte von NRPS-ähnlichen Genen exprimierenden *S. cerevisiae* Kulturen 48 Stunden nach der Induktion. UV-Chromatogramme von 296 nm sind in schwarz, die zugehörigen Chromatogramme der $[M + H]^+$ Ionen sind in Farbe abgebildet

4.1.3.6. Strukturaufklärung

Aufgrund der hohen Identitätsübereinstimmung von 66% von AstA und AtqA zu TdiA wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei den Produkten von AstA und AtqA um Didemethylasterrichinon D (DDAQ D) handeln könnte. Auch die durch die LC-MS Analyse

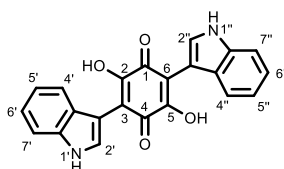
detektierten Massen der beiden Produktpeaks stimmen mit der theoretischen $[M + H]^+$ von $m/z = 371.1026$ überein.

Für die Isolierung des Produktes mittels HPLC wurden die pEH26 tragenden Kulturen unter Standardbedingungen im 3 l Maßstab kultiviert. Von der isolierten Substanz wurde ein ^1H -NMR-Spektrum in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ aufgenommen. Das Spektrum befindet sich in Abbildung 7-8 im Anhang. Als Referenz diente das $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ -Signal. Die NMR-Daten sind in Tabelle 4-4 zusammengestellt.

Der Indol-Rest konnte leicht durch die Signale für die vier gekoppelten Protonen und einem Duplett für das mit dem NH des Indolrings gekoppelte fünfte Proton identifiziert werden (Liao et al. 2018; Pirrung et al. 2005). Es wurde nur ein Satz an Signalen beobachtet, da das Molekül symmetrisch ist. Auch der Vergleich der erworbenen Daten mit in der Literatur hinterlegten Werten bestätigt eindeutig die Synthese von DDAQ D durch AstA (Balibar et al. 2007). Da in den LC-MS Analysen von den AstA und AtqA expremierenden Kulturen die Retentionszeiten, das UV-Spektrum und die detektierten $[M + H]^+$ -Ionen von $m/z = 371.1026$ übereinstimmen, konnte auch für AtqA die Herstellung von DDAQ D bestätigt werden.

Tabelle 4-4: ^1H -NMR-Daten der Produkte von AstA

Didemethylasterrichinon D



Lsg.-mittel	$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$
Position	δ_{H} , multi, J in Hz
1'	10.64, s (NH)
2'	7.68, d, 2.6
4'	7.64, dd, 8.0, 1.1
5'	7.05, ddd, 8.0, 7.0, 1.1
6'	7.14, ddd, 8.2, 7.2, 1.1
7'	7.46, dt, 8.1, 0.9
1''	10.64, s, (NH)
2''	7.68, d, 2.6
4''	7.64, dd, 8.0, 1.1
5''	7.05, ddd, 8.0, 7.0, 1.1
6''	7.14, ddd, 8.2, 7.2, 1.1
7''	7.46, dt, 8.1, 0.9

Die Daten stimmen mit denen aus der Literatur für Didemethylasterrichinon D überein (Balibar et al. 2007; Liao et al. 2018; Pirrung et al. 2005).

4.1.4. Nachweis der Überproduktion von NRPS-ähnlichen Proteine in *S. cerevisiae* Kulturen

Für Aktivitätstest und die Charakterisierung der Proteine sollten die NRPS-ähnlichen Proteine aus den *S. cerevisiae* Kulturen isoliert werden. Dafür sollten die Gene zunächst mit einem Affinitäts-Tag versehen werden. Hierzu wurden zunächst die Gene *avpA*, *atrA_{At}* und *melA* von der cDNA aus *A. terreus* FGSC A1156 und CHGG_03687 von der gDNA aus *C. globosum* NRRL 1870 mit den in Tabelle 4-5 hinterlegten Primern amplifiziert und in den pGemT® easy Vektor kloniert.

Tabelle 4-5: Übersicht über die hergestellten Konstrukte der NRPS-ähnlichen Gene mit verschiedenen Affinitäts-Tags.

Gen	Primer	Klonierungs-konstrukt	Restriktions-enzyme	Expressions-vektor	Tag Überhang	[kDa]
<i>avpA</i>	2004_1_fwd, 2004_3_rvs	pEH17	EcoRI + SpeI	pEH7	FLAG (14 AS)	104,5
<i>atrA_{At}</i>	3090_1_fwd, 3090_3_rvs	pEH18	NotI + SpeI	pEH9	FLAG (14 AS)	103,4
<i>melA</i>	3563_1_fwd, 3563_3_rvs	pEH21	NotI + SpeI	pEH22	FLAG (15 AS)	104,0
<i>astA</i>	3687_1_fwd, 3687_2_rvs	pEH20	EcoRI + NotI	pEH12	FLAG (16 AS)	107,4
<i>avpA</i>	2004_4_for & 2004_6_HIS_rvs			pEH6	HIS ₆ (6 AS)	103,6
<i>btyA</i>	2815_1_fwd, 2815_4_HIS_rvs			pEH57	HIS ₆ (6 AS)	103,4
<i>pgnA</i>	8899_4_fwd, 8899_7_HIS_rvs			pEH56	HIS ₆ (6 AS)	105,3
<i>avpA</i>	2004_7_HIS_fwd & 2004_5_rvs			pEH25	HIS ₆ (6 AS)	103,6
<i>btyA</i>	2815_3_HIS_fwd, 2815_2_rvs			pEH41	HIS ₆ (6 AS)	103,4
<i>pgnA</i>	8899_5_HIS_fwd, 8899_6_rvs			pEH28	HIS ₆ (6 AS)	105,3

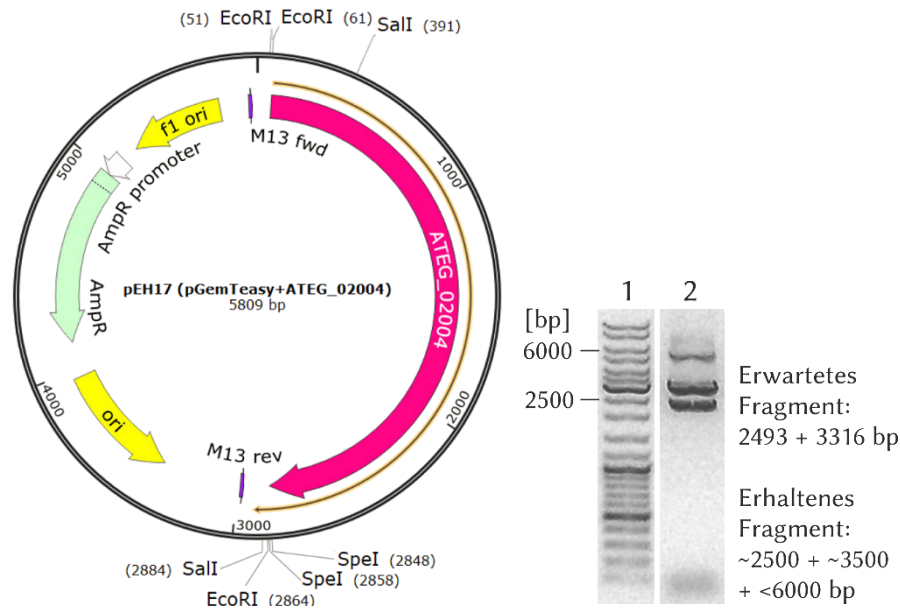


Abbildung 4-29: Vektorkarte von pEH17 (ATEG_02004 ohne Stopkodon in pGemT® easy) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. Zur Umklonierung wurden EcoRI und SpeI verwendet. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH17 mit SalI verdaut.

Aus den entstandenen Plasmiden pEH17 (*apvA*), pEH18 (*atrA_{At}*), pEH21 (*melA*) und pEH20 (*astA*) wurden die Gene mit den benötigten Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten und in den pESC-URA Vektor eingefügt (Tabelle 4-5). In der Abbildung 4-29 und Abbildung 4-30 sind beispielhaft die Kontrollverdaue und Konstrukte für *apvA* dargestellt.

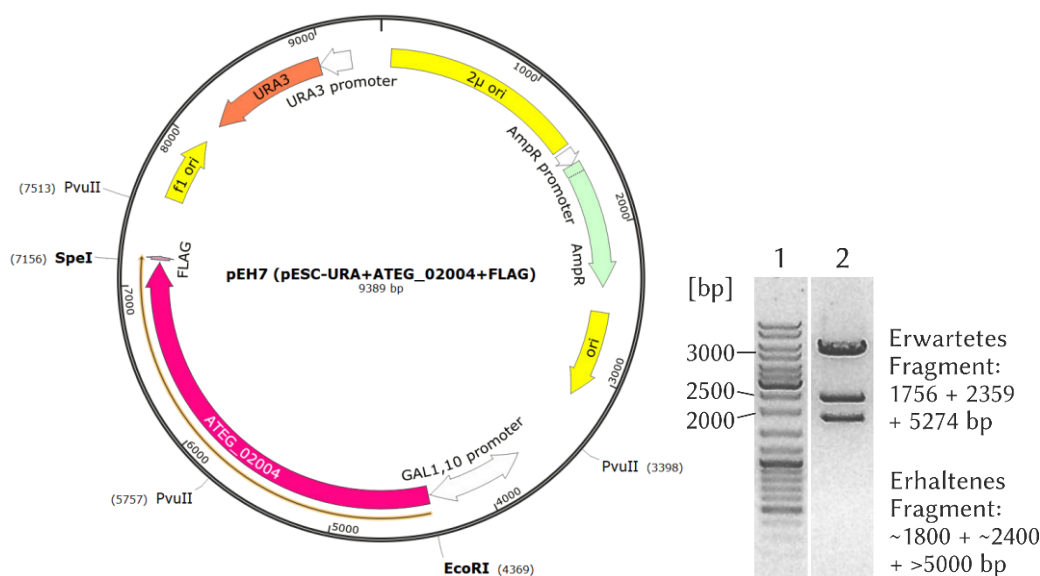


Abbildung 4-30: Vektorkarte von pEH7 (ATEG_02004 mit C-terminalen FLAG-Tag in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. Zur Umklonierung wurden EcoRI und SpeI verwendet. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH7 mit PvuII verdaut.

Die Plasmide wurden in den *S. cerevisiae* Stamm BJ5464_NpgA transformiert und die Überproduktion der Proteine in 100 ml SC-URA Medium, die mit 2 % Galaktose versetzt war, in einem 500 ml Erlenmeyerkolben induziert. Nach 48 Stunden Kultivierung bei 30 °C wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, aufgeschlossen und die Proteine isoliert. Leider konnten jedoch mittels SDS-PAGE keine erwarteten Proteine nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde ein WesternBlot durchgeführt, der einen spezifischen Nachweis der Proteine mittels Antikörpern ermöglicht.

Die Plasmide pEH7, pEH9, pEH12 und pEH22 sowie der pESC-URA Vektor als Negativkontrolle wurden in *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA transformiert und kultiviert. Von den Kulturen wurden, wie in Kapitel 3.6.4.1 beschrieben, zu unterschiedlichen Zeiten Proben gezogen und nach der Entnahme aller Proben der Western Blot durchgeführt. Beispielhaft sind die Ergebnisse für Proteinexpression von Mela und AstA sowie der Negativkontrolle mit dem pESC-URA Vektor abgebildet (Abbildung 4-31).

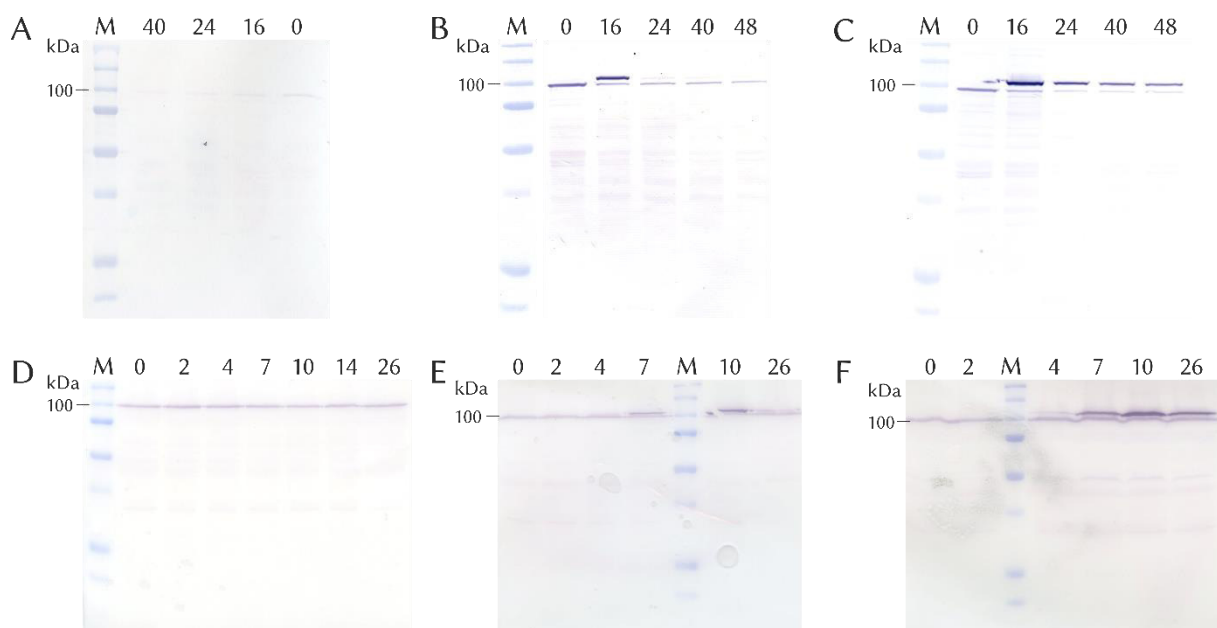


Abbildung 4-31: Membranen des WesternBlots zur Detektion von AstA und Mela in *S. cerevisiae*. A+D) Negativkontrolle; B-E) Mela-Flagg; C+F) AstA-Flagg

Trotz des für den FLAG-Tag spezifischen Antikörpers ist auf allen Membranen ein Hefeprotein von ca. 100 kDa detektiert worden (Abbildung 4-31). Die etwa 104 kDa großen Fusionsproteine lassen sich jedoch als eine eigenständige Bande leicht oberhalb der Hefeproteinbande erkennen. Die für die Fusionsproteine spezifischen Banden erscheinen etwa nach vier Stunden und sind am deutlichsten bei 10 bzw. 16 Stunden zu sehen. Danach verblassen sie wieder. Damit erklärt sich auch, warum bei der Isolierung der NRPS-ähnlichen Proteine nach 48 Std. kein Protein gewonnen werden konnte. Für folgende

Proteinisolationen sollte die Kultur daher für einen Zeitraum von ca. 16 Std. kultiviert werden.

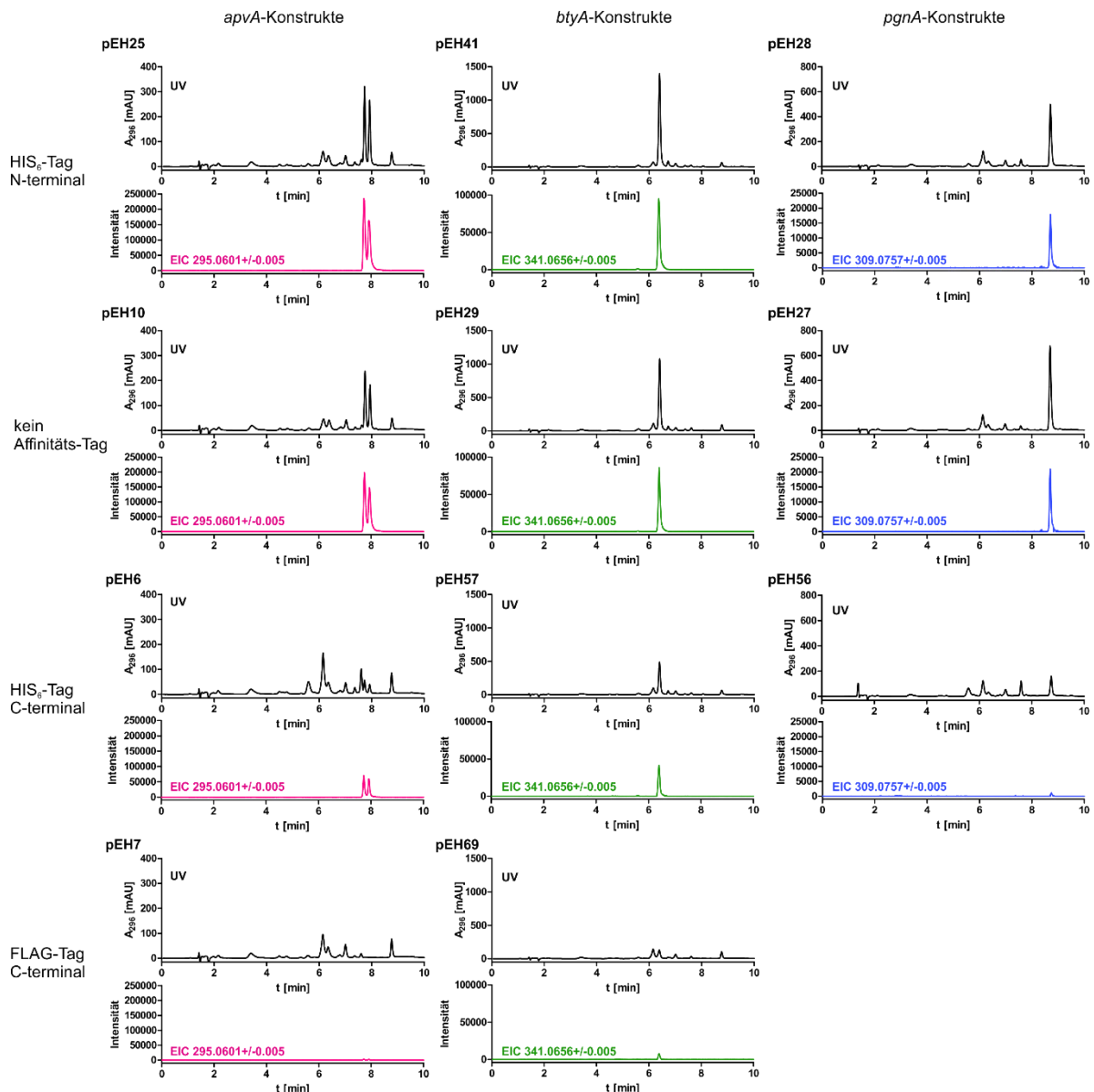


Abbildung 4-32: LC-MS Analyse der Produktbildung in den Kulturen, die Konstrukte ohne und mit C- bzw. N-terminalem Affinitäts-Tag exprimieren. UV-Chromatogramme von 296 nm sind in schwarz, die sind zugehörigen Chromatogramme der $[M + H]^+$ Ionen sind in Farbe abgebildet

Bei der Probenentnahme für den Western Blot wurden auch je 1 ml Kultur für eine Extraktion der Sekundärmetabolite entnommen. Die Kultur wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 1:1 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden mit Hilfe der Speedvac eingengt und anschließend für eine Analyse an der LC-MS in 500 μ l Methanol gelöst. In den Proben konnten die zu den Proteinen gehörenden Metabolite nur in Minimalen Mengen detektiert werden (Abbildung 4-32). Da durch die Fusionierung mit dem FLAG-Tag ein etwa 14 AS langer Überhang am C-Terminus der Proteine entstanden war, könnte dieser die Funktionalität des Proteins beeinflussen. Ein kürzerer Tag könnte die

Aktivität des Proteins weniger beeinflussen. Zum Testen dieser Hypothese wurde an die Gensequenz von *apvA*, *btyA* und *pgnA* durch die Verwendung der in Tabelle 4-5 aufgeführten Primer eine Sequenz für einen C-terminaler HIS₆-Tag angefügt. Die Gene wurde wiederum in den pESC-URA Vektor eingebracht, in *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA transformiert und in 2 % Galaktose enthaltenden SC-URA Medium kultiviert. Es wurden Proben für einen WesternBlot und eine Analyse der Sekundärmetabolite entnommen. Leider konnten auch für diese Konstrukte, verglichen mit den originalen Proteinen, nur eine sehr geringe Mengen an den entsprechenden Sekundärmetabolite detektiert werden.

Da das Anfügen von C-terminalen Aminosäuren die Aktivität der Proteine beeinträchtigt, sollte stattdessen ein N-terminalen Affinitäts-Tag verwendet werden. Dafür wurden Primer designed, die neben einer komplementären Sequenz für den pESC-URA Vektor auch eine Sequenz für N-terminalen HIS₆-Tag an die Gene anfügt (Tabelle 4-5). Die PCR-Amplifikate wurden wiederrum mittels homologer Rekombination in den pESC-URA Vektor eingefügt. Als Beispiel ist in Abbildung 4-33 die Vektorkarte und der zugehörige Restriktionsverdau von pEH25 abgebildet.

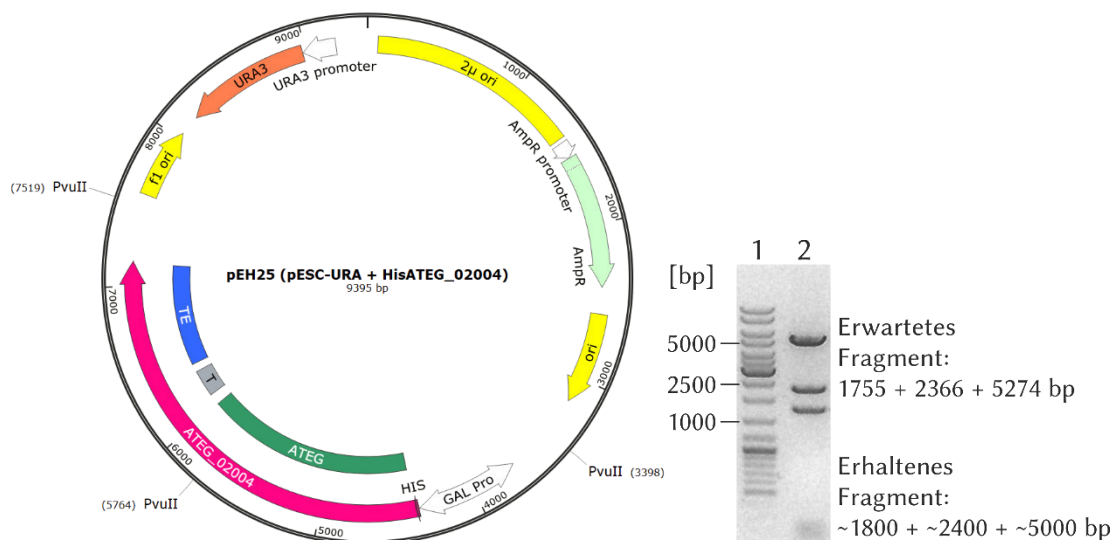


Abbildung 4-33: Vektorkarte pEH25 (ATEG_02004 mit N-terminalen HIS₆-Tag in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH7 mit PvuII verdaut.

Um die Produktivität der rekombinanten NRPS-ähnlichen Proteine zu überprüfen, wurden die Expressions-Konstrukte in *S. cerevisiae* transformiert, die Transformanten kultiviert und schließlich die Sekundärmetabolitprofile analysiert. Wie in Abbildung 4-32 dargestellt, entspricht die Ausbeute an Produkten, welcher durch die N-Terminal modifizierten Proteine generiert wurde, etwa dem der Enzyme ohne einen Affinitäts-Tag. Da durch den N-terminalen HIS₆-Tag kein negativer Effekt auf die Enzyme ausgeübt wird, sollten

diese Konstrukte für eine Isolierung der NRPS-ähnlichen Enzyme und eine anschließende biochemische Charakterisierung der Proteine verwendet werden.

4.1.4.1. Überproduktion und Aufreinigung der NRPS-ähnlichen Protein

Die Überproduktion von His₆-ApvA, His₆-BtyA und His₆-PgnA erfolgte mit pEH25, pEH41 bzw. pEH28 in *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA. Um die Selektion so lange wie möglich aufrecht zu erhalten, wurde die Vorkultur in SC-Medium angezogen. Die Expression der Proteine erfolgt im 500 ml Maßstab in YPD-Medium unter Zugabe von 2 % Galaktose bei einer Inkubation von 30°C für 16 Stunden. Die Hefezellen wurden geerntet und wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben aufgeschlossen. Der gewonnene Proteinextrakt wurde für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose nach dem Protokoll in 3.6.2 eingesetzt. Die Proteine wurden in 100 µl Aliquots bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die theoretische Größe der Proteine beträgt 103,6 kDa für ApvA, 103,4 kDa für BtyA und 105,3 kDa für PgnA. Eine Analyse der während der Aufreinigung gewonnenen Fraktionen mittels SDS-Page zeigte, dass kein oder nur sehr wenig Protein in den anderen Fraktionen verblieb. Die gewonne Proteinkonzentration nach der Umpufferung lag für ApvA bei 0,7 mg/l, für BtyA bei 1,2 mg/l und für PgnA bei 0,5 mg/l.

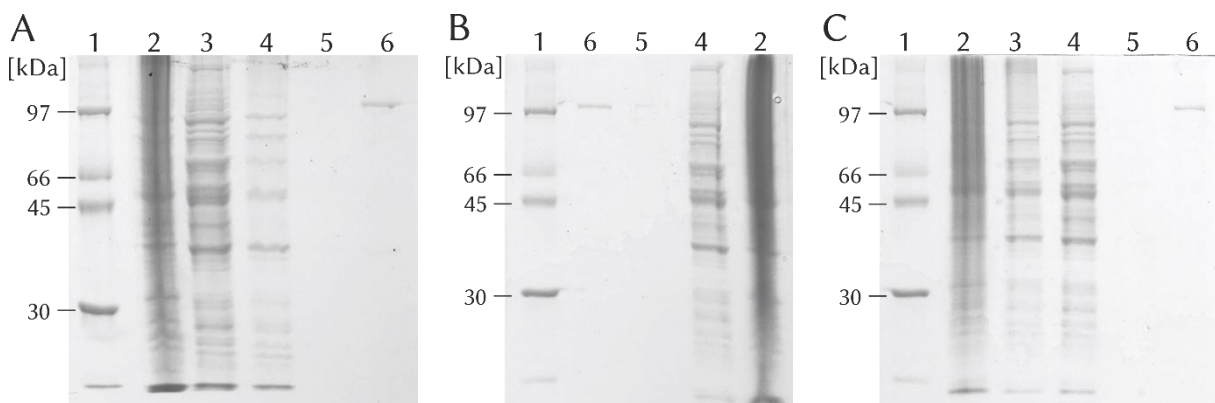


Abbildung 4-34: SDS-PAGE der Aufreinigung von A) HIS₆-ApvA, B) HIS₆-BtyA und C) HIS₆-PgnA aus *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA. 1) Protein-Größenstandard; 2) unlösliches Protein; 3) lösliches Protein; 4) Durchflussfraktion; 5) Waschfraktion; 6) NiNTA-Elutionsfraktion

4.1.4.2. Überprüfung der Aktivität von den NRPS-ähnlichen Enzyme mit einem HIS₆-Affinitäts-Tag *in-vivo*

Durch die Expression der Proteine in *S. cerevisiae* war davon auszugehen, dass 4-Hydroxyphenylpyruvat das natürliche Substrat für ApvA und BtyA ist, und Phenylpyruvat das natürliche Substrat für PgnA. 10 µg-100 µg des überproduzierten und aufgereinigten Proteins wurden zunächst mit 5 mM Substrat, in Anwesenheit von 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP,

in 50 mM Tris/HCl (pH7,5) für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch dreimaliges Extrahieren mit Ethylacetat wurde die Reaktion abgestoppt. Die Proben wurden an der LC-MS vermessen. Leider konnte für keinen der Aktivitätstests das erwartete Produkt detektiert werden. Daher wurden die Bedingungen getestet, die für andere NRPS-Enzyme erfolgreich waren (Tabelle 4-6) (Geib et al. 2016; Schneider et al. 2008; Wackler et al. 2012). Zusätzlich wurde der Inkubationszeitraum auf 12 Std. ausgedehnt und die Enzymtests bei 25 °C, 30 °C und 37 °C durchgeführt. Trotzdem konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden.

Tabelle 4-6: Zusammensetzung der getesteten Aktivitätsassays

Substanz	Konzentration	Konzentration	Konzentration
Substrat	7,5 mM	1,8 mM	1 mM
MgCl ₂	10 mM	5 mM	5 mM
ATP	5 mM	1,8 mM	5 mM
Puffer	100 mM	50 mM	50 mM
DTT	2,5 mM	-	-
EDTA	-	-	125 nM

Zur Überprüfung, ob das Protein bei der Aufreinigung über die N-NTA-Agarose inaktiviert wurde, wurden auch Aktivitätstests mit dem Gesamtproteinextrakt aus den aufgeschlossenen Hefezellen durchgeführt. Es konnte auch hier für keines der NRPS-ähnlichen Proteine eine Aktivität nachgewiesen werden.

4.1.5. Klonierung der NRPS-ähnlichen Gene und des Phosphopantethenyltransferase Gens NpgA für eine Expression in *E. coli*

Da *in vitro* keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, war es trotz der erfolgreichen Isolierung der NRPS-ähnlichen Enzyme nicht möglich die Proteine biochemisch zu charakterisieren. Es ist möglich, dass durch die Aufreinigungsmethode aus der Hefe das Protein zerstört wurde. Daher wurde eine Expression der NRPS-ähnlichen Gene in *E. coli* angestrebt. Das Primerpaar pET28_His-tag_f und HIS8_ESC_MSC1_r wurde verwendet um die Gene für eine homologe Rekombination in den pET28a (+) Vektor zu amplifizieren (Tabelle 3-12). Die entstandenen Plasmide (pEH107 (*apvA*), pEH108 (*btyA*), pEH109 (*melA*), pEH110 (*pgnA*), pEH110 (*astA*)) wurden zur Kontrolle der korrekten Inserierung sequenziert. Exemplarisch ist in Abbildung 4-35 die Vektorkarte und der Kontrollverdau von pEH107 zu sehen.

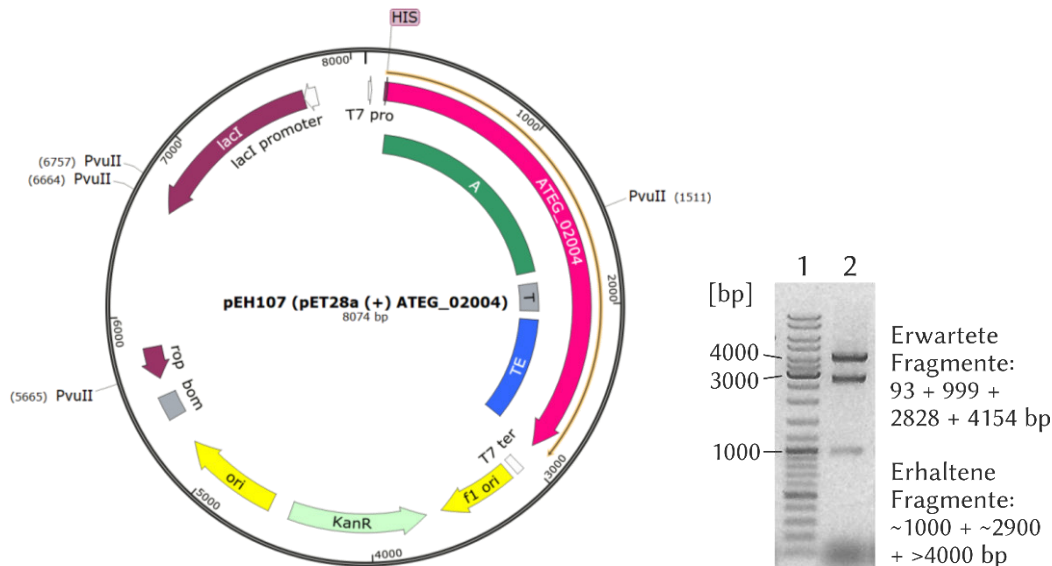


Abbildung 4-35: Vektorkarte pEH107 (ATEG_02004 mit N-terminalen HIS₆-Tag in pET28a (+)) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH107 mit PvuII verdaut.

Für die Klonierung in den pQE60 Vektor wurden die Primer QE-HIS-tag-f und QE-ESC-MCS1-r genutzt (Tabelle 3-12). In Abbildung 4-36 sind die Vektorkarte von pEH74 mit dem zugehörigen Kontrollverdau als Stellvertreter für die entstandnen Plasmide (pEH74 (*apvA*), pEH75 (*btyA*), pEH76 (*atrA_{At}*) pEH77 (*melA*), pEH78 (*pgnA*), pEH79 (*astA*)) dargestellt.

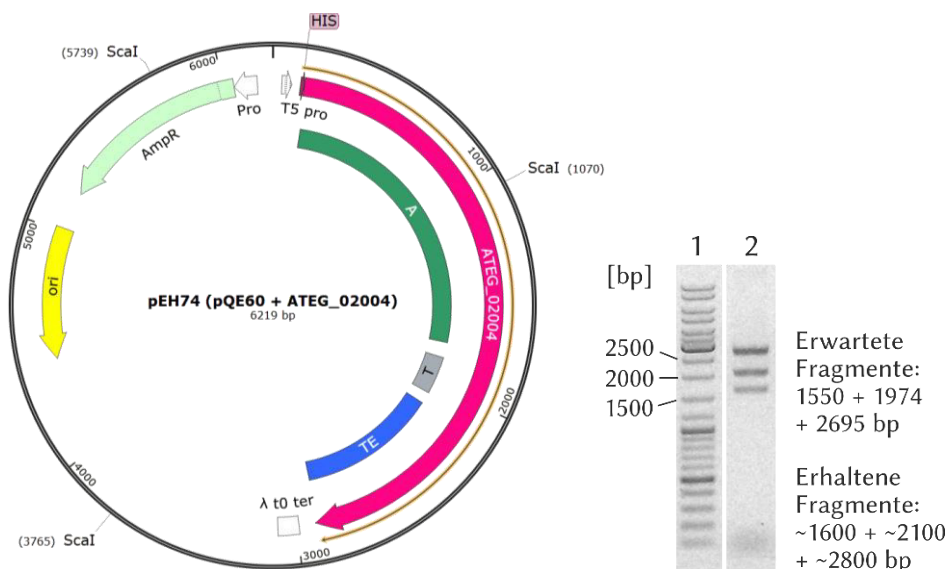


Abbildung 4-36: Vektorkarte pEH74 (ATEG_02004 mit N-terminalen HIS₆-Tag in pQE60) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH74 mit ScaI verdaut.

In *E. coli* gibt es, wie auch in der Bäckerhefe, keine Phosphopantethenyltransferase, die in der Lage ist, die modularen Proteine wie die NRPS-ähnlichen Enzyme aus Ascomyceten zu modifizieren. Daher wurde das *npgA*-Gen aus *A. nidulans*, welches für die Konstruktion von

dem *S. cerevisiae* Stamm KO3 verwendet worden war, in den pET28a(+) Vektor eingebracht (Abbildung 4-37). Für die Amplifikation von pKO4 wurde das Primerpaar HIS_NpgA_fwd und NpgA_rvs verwendet (Tabelle 3-12).

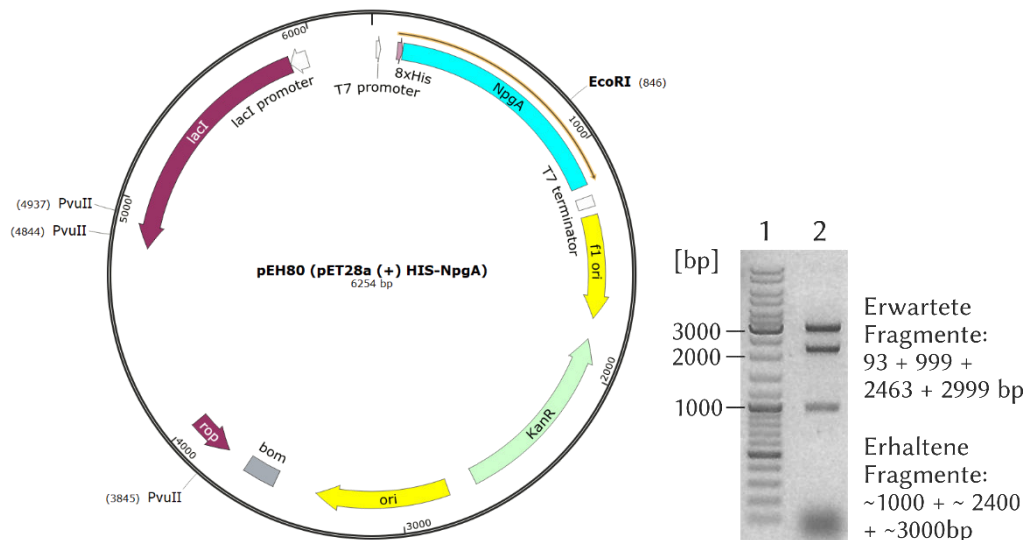


Abbildung 4-37: Vektorkarte pEH80 (AN6140 mit N-terminalen HIS₈-Tag in pET28a (+)) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH80 mit PvuII verdaut.

Im Zeitlauf der hier dargestellten Arbeit konnte die Expression und anschließende Isolierung der NRPS-ähnlichen Proteine nicht mehr durchgeführt werden.

4.1.6. Zielgerichteter Austausch von Domänen der NRPS-ähnlichen Enzyme zur Generierung anderer Produkte

4.1.6.1. Einleitung

Wie bereits in Kapitel 1.2.6 beschrieben, ermöglicht die strukturelle Organisation von NRPS-Enzymen theoretisch eine Rekonstruktion der Proteine und so die Herstellung neuerer Produkte. Da NRPS-ähnliche Enzyme lediglich aus einem Modul bestehen, ist eine Kombination von Modulen natürlich nicht möglich. Allerdings wurden für NRPS-ähnliche A-Domänen bisher keine Strukturaufklärung durchgeführt und auch die Vorhersage für die aktivierten Substrate mit Hilfe von entsprechenden bioinformatischen Programmen ist oftmals nicht möglich. In NRPS-ähnlichen Proteinen sind die drei Domänen jeweils durch einen etwa 30 Aminosäure langen Bereich getrennt, der funktionell keiner Domäne zugeordnet wird (Abbildung 7-1). In einer Studie von 2016 wurden diese Bereiche genutzt, um die A-Domäne bzw. die A/T-Domänen von ApvA und PgnA mit der TE-Domäne bzw. T/TE-Domäne von BtyA vertauscht. Wie zu erwarten, wurde durch die ApvA/BtyA Hybrid-Proteine weiterhin Butyrolactone IIa produziert. Auch die Kombination aus PgnA/BtyA führte zu der Expression eines aktiven Proteins und resultierte in der Synthese von Phenylbutyrolacton IIa, welches zuvor noch nie aus Ascomyceten isoliert worden ist (Dijk et al 2016). Bei dieser Rekombination besteht der Unterschied der beiden Substrate jedoch lediglich in der Hydroxylgruppe am Benzolring der beiden Ketosäuren.

Weiterführend sollten systematisch die Domänen zwischen den NRPS-ähnlichen Enzymen ausgetauscht werden, die für die Aktivierung unterschiedlicher Substrate und die Bildung der verschiedenen Kernstrukturen verantwortlich sind (Abbildung 4-38).

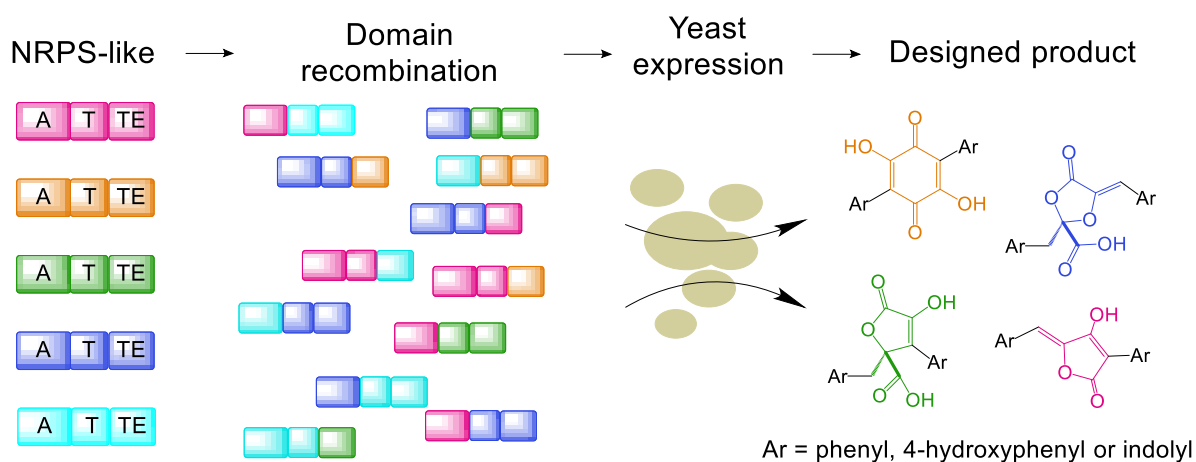


Abbildung 4-38: Geplanter Ablauf der Klonierung und Expression von NRPS-ähnlichen Hybrid-Proteinen

4.1.6.2. Fusionierung der Domänen aus unterschiedlichen NRPS-ähnlichen Genen mit Hilfe von Klonierung

Die Fusion der verschiedenen Domänen aus den NRPS-ähnlichen Enzymen sollte über homologe Rekombination in *E. coli* erfolgen. Die Expression der rekonstruierten Proteine sollte ebenfalls in *S. cerevisiae* mit Hilfe des pESC-URA Vektors durchgeführt werden. Daher konnten die Primer KAB-pESC-MCS1rvs und KAB-pESC-MCS1for verwendet werden, die eigentlich zur Sequenzierung des Vektors genutzt werden. Die Nutzung dieser Primer führt zu einem komplementärer Bereich des PCR-Amplifikates, der die Re-Integration in den pESC-URA Vektor ermöglicht.

Die A bzw. A/T-Domänen wurden mit KAB-pESC-MCS1rvs und einem Primer amplifiziert, der keinen homologen Bereich einfügt. Somit können die mittels PCR amplifizierten Produkte für eine Vielzahl von Rekombinationen der Domänen eingesetzt werden.

Tabelle 4-7: Übersicht über die amplifizierten A- oder A/T-Domänen zur Konstruktion der Hybrid-Gene

Gen	Domäne	Expressions-konstrukt	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)	Template
ATEG_02004	A	pEH58; pEH59; pEH60; pEH119	2004-A-rvs	KAB-pESC-MCS1rvs	pEH25
ATEG_08899	A	pEH61; pEH62; pEH63; pEH64	8899-A-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH28
ATEG_00700	A	pEH93; pEH97; pEH116; pEH117	0700-A-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH91
CHGG_03687	A	pEH65; pEH66; pEH67; pEH68	3687-A-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH54
ATEG_02004	A & T	pEH48; pEH49; pEH50; pEH118	2004-T-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH25
ATEG_08899	A & T	pEH51; pEH52; pEH53; pEH120	8899-T-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH28
ATEG_00700	A & T	pEH70; pEH71; pEH72; pEH73	0700-T-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH91
CHGG_03687	A & T	pEH112; pEH113; pEH114; pEH115	3687-T-rvs	KAB-pESC-MCS1for	pEH54

Für die Amplifikation der T/TE bzw. TE-Domänen wurde neben dem Primer KAB-pESC-MCS1for ein Primer verwendet, der spezifisch ist für die benötigten Domänen des jeweiligen Gens und die komplementäre Sequenz zu der geplanten Nachbardomäne trägt (Tabelle 4-8). Die Amplifikation von den Domänen von den zugehörigen Plasmiden erfolgte

mit der Phusion-Polymerase bei einer Annealing Temperatur von 58 °C und einer Elongationszeit von 30 Sekunden.

Tabelle 4-8: Übersicht über die amplifizierten T/TE- oder TE-Domänen zur Konstruktion der Hybrid-Gene

Gen	Domäne	Expressions-konstrukt	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)	Template
ATEG_02004	TE	pEH53	2004TE_8899for	KAB-pESC-MCS1for	pEH25
	T/TE	pEH61	2004_T_8899fwd		
	TE	pEH112	2004TE_0700for		
	T/TE	pEH116	2004_T_0700fwd		
	TE	pEH70	2004TE_3687for		
	T/TE	pEH65	2004_T_3687fwd		
ATEG_02815	TE	pEH118	2815TE_2004for	KAB-pESC-MCS1for	pEH29
	T/TE	pEH119	2815_T_2004fwd		
	TE	pEH120	2815TE_8899for		
	T/TE	pEH62	2815_T_8899fwd		
	TE	pEH113	2815TE_0700for		
	T/TE	pEH97	2815_T_0700fwd		
	TE	pEH66	2815TE_3687for		
	T/TE	pEH71	2815_T_3687fwd		
ATEG_03090	TE	pEH49	3090TE_2004for	KAB-pESC-MCS1for	pEH55
	T/TE	pEH58	3090_T_2004fwd		
	TE	pEH52	3090TE_8899for		
	T/TE	pEH63	3090_T_8899fwd		
	TE	pEH114	3090TE_0700for		
	T/TE	pEH117	3090_T_0700fwd		
	TE	pEH72	3090TE_3687for		
	T/TE	pEH67	3090_T_3687fwd		
ATEG_08899	TE	pEH50	8899TE_2004for	KAB-pESC-MCS1for	pEH27
	T/TE	pEH60	8899_T_2004fwd		
	TE	pEH115	8899TE_0700for		
	T/TE	pEH93	8899_T_0700fwd		
	TE	pEH73	8899TE_3687for		
	T/TE	pEH68	8899_T_3687fwd		
CHGG_03687	TE	pEH48	3687TE_2004for	KAB-pESC-MCS1for	pEH26
	T/TE	pEH59	3687_T_2004fwd		
	TE	pEH51	3687TE_8899for		
	T/TE	pEH64	3687_T_8899fwd		

Die PCR-Produkte wurden gefällt und einem Verdau mit *DraI* unterworfen, um den Ursprungsvektor zu zerstören und dann erneut über eine Ethanol-fällung aufgereinigt. Der pESC-URA-Vektor wurde mit *EcoRI* und *SpeI* geöffnet und mit SAP dephosphoryliert bevor er ebenfalls über eine Ethanol-fällung aufgereinigt wurde. Nach der Konzentrationsbestimmung am NanoDrop wurden 100 ng geöffneter pESC-URA-Vektor mit 200 ng des größeren Fragmentes und 300 ng des kleineren Fragmentes zur homologen

Rekombination in *E. coli* XL1 blue Zellen transformiert. Jeweils 6 der entstanden Kolonien wurden angezogen und das isolierte Plasmid mittels Restriktionshydrolyse untersucht. Die korrekte Integration und Rekombination der Gene wurde anhand von Sequenzierung bestätigt. Stellvertretend für die insgesamt 32 Konstrukte sind die Vektorkarten und Kontrollverdaue von pEH58 und pEH49 in den Abbildung 4-39 und Abbildung 4-40 dargestellt.

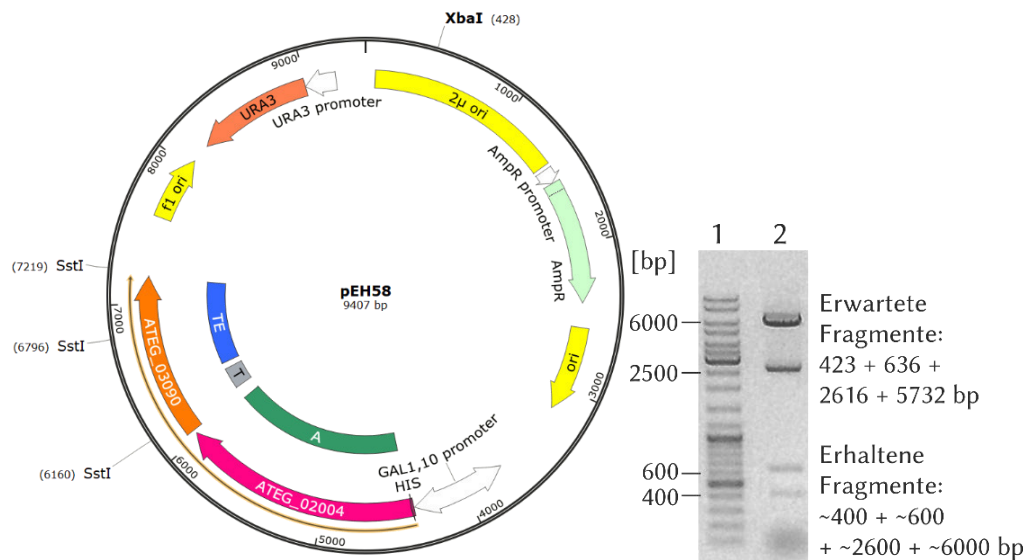


Abbildung 4-39 Vektorkarte von pEH58 (A-Domäne von ATEG_02004 fusioniert mit T/TE-Domäne von ATEG_03090 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH58 mit *SstI* verdaut.

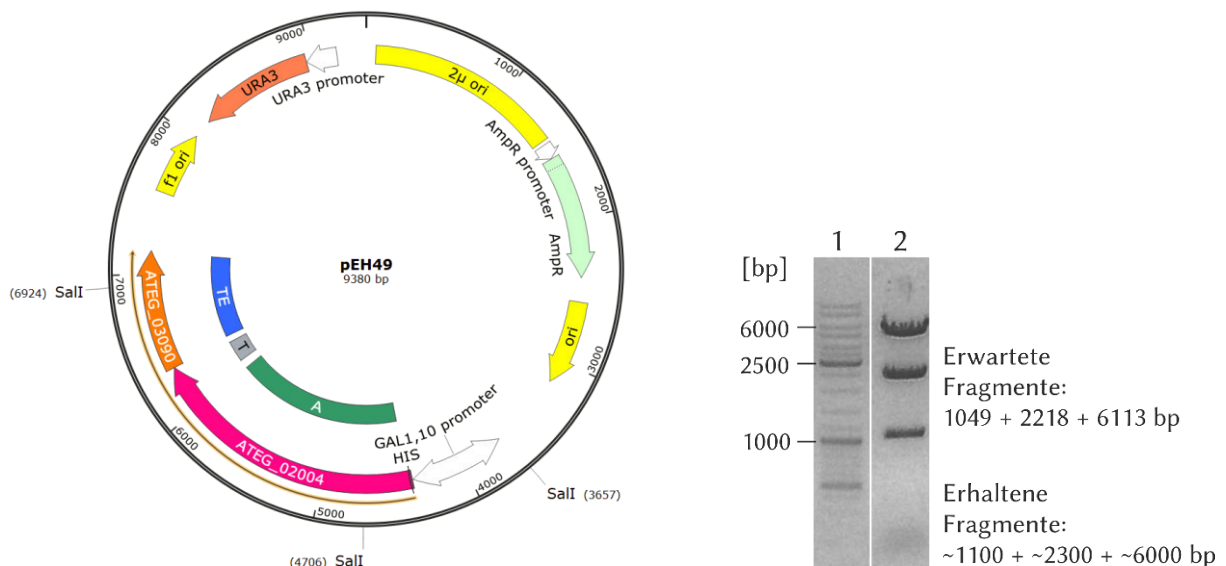


Abbildung 4-40 Vektorkarte von pEH49 (A/T-Domäne von ATEG_02004 fusioniert mit TE-Domäne von ATEG_03090 in pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH49 mit *SalI* verdaut.

4.1.6.3. Überproduktion der Rekombinations-Enzyme

Die 16 Plasmide, die die A-Domäne von ApvA oder PgnA enthalten und somit Pyruvat oder 4-Hydroxyphenylpyruvat aktivieren, wurden in den *S. cerevisiae* Stamm BJ5464_NpgA transformiert. Die restlichen 16 Konstrukte, welche die A-Domäne von AstA oder AtqA aufweisen und Indolpyruvat als Substrat verwenden, wurden in den *S. cerevisiae* Stamm KO3 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der pESC-URA Vektor in beide Hefestämme transformiert. Mit der Vorkultur wurde 50 ml SC-URA Medium mit 2 % Galaktose auf eine optische Dichte von 0,1, bei einer Wellenlänge von 600 nm angeimpft. Nach 48 Std. Kultivierung wurden die Kulturen im Scheidetrichter dreimal mit 1:1 Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt und bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde das Pellet in Methanol rückgelöst und an der LCMS vermessen.

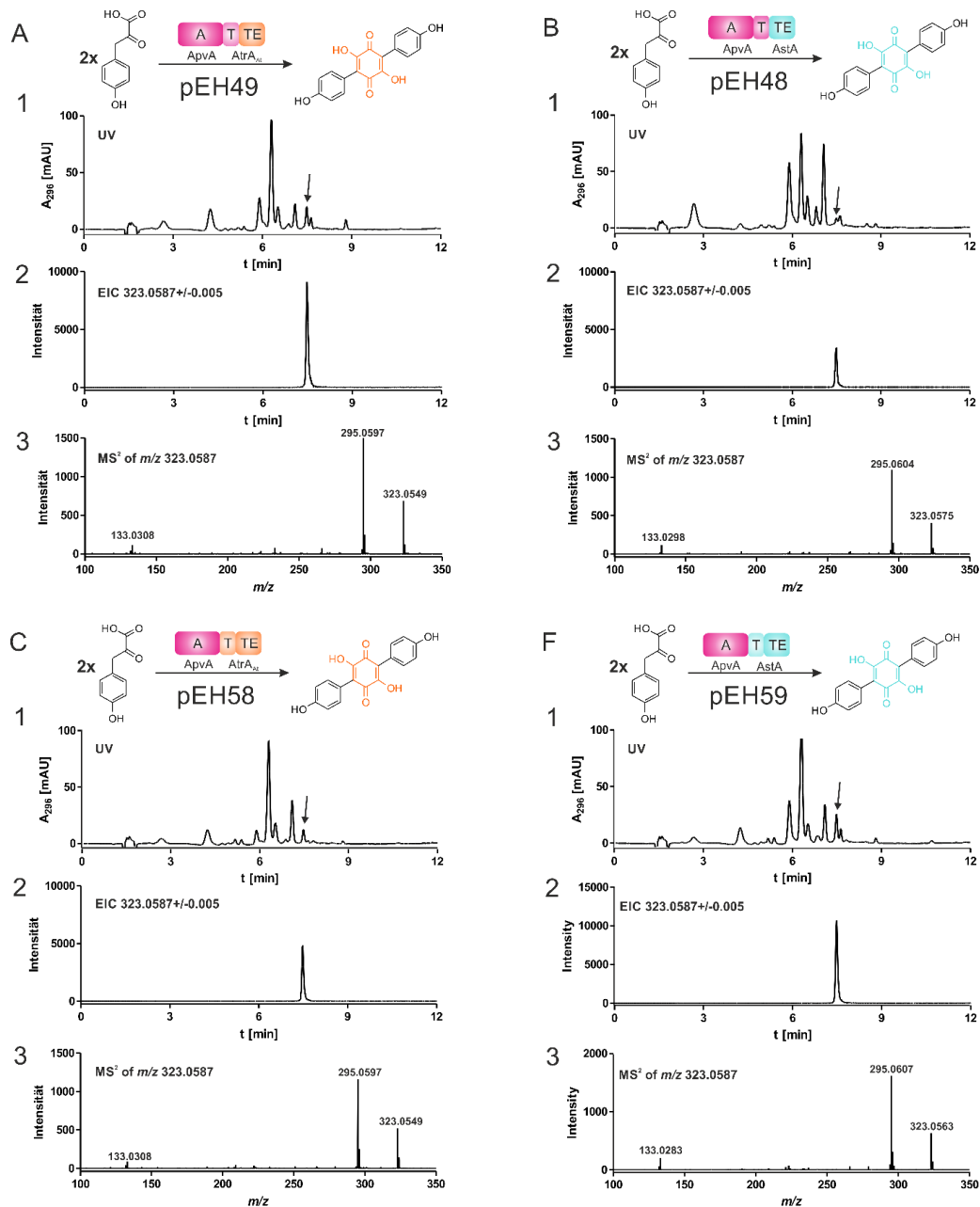


Abbildung 4-41: LC-MS Analytik der Metabolitenprofile von *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA Kulturen, die Hybrid-Proteinen mit der A-Domäne von ApvA exprimieren. (1) Die Absorption bei 296 nm, (2) extrahierten Ionenchromatogramme und (3) Fragmentierungs-Muster von $[M + H]^+$ sind dargestellt.

In den Konstrukten, die die A- bzw A/T-Domänen von ApvA und die T/TE bzw. TE-Domäne von BtyA (pEH118 und pEH119), PgnA (pEH50 und pEH60), AtrA_{At} (pEH49 und pEH 58) bzw. AstA (pEH48 und pEH59) enthalten, konnte in allen UV-Chromatogrammen ein deutlich erkennbarer Produktpeak nachgewiesen werden. (Abbildung 4-41, Abbildung 4-42). Da BtyA und AtrA_{At} wie auch ApvA 4-Hydroxyphenylpyruvat als Substrat verwenden, war dies für die entsprechenden Rekombinationen nicht weiter verwunderlich. Besonders in beiden rekonstruierten Proteinen mit der TE-Domäne von BtyA dominieren die Produktpeaks das Chromatogramm (Abbildung 4-42).

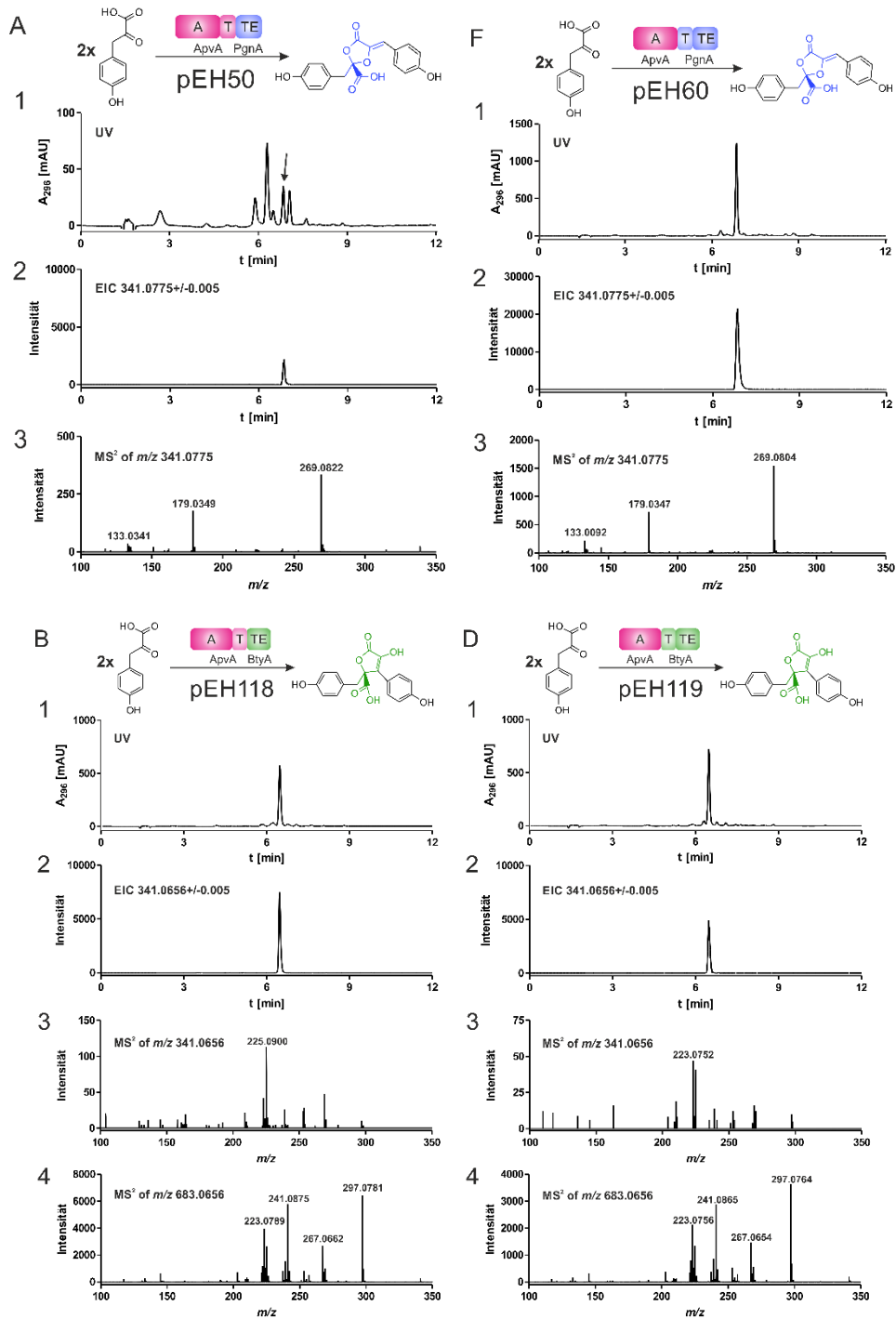


Abbildung 4-42: LC-MS Analytik der Metabolitenprofile von *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA Kulturen, die Hyrid-Proteinen mit der A-Domäne von ApvA exprimieren. (1) Die Absorption bei 296 nm, (2) extrahierten Ionenchromatogramme und (3) Fragmentierungs-Muster von $[M + H]^+$ sind dargestellt.

Der Unterschied der Substrate von ApvA und PgnA besteht lediglich aus einer Hydroxylgruppe am Aromaten, daher war auch die Dimerisierung von Hydroxyphenylpyruvat durch die TE-Domäne von PgnA erwartet worden. In dem Konstrukt mit der T/TE-Domäne von PgnA stellt Hydroxyguignarsäure in den analysierten Chromatogramm den dominanten Peak darstellt. Trotz der relativ großen Unterschiede der

Substrate konnte selbst bei der Rekombination der Indol-3-pyruvat kondensierenden TE-Domäne von AstA mit der A oder A/T-Domäne von ApvA das erwartete Produkt nachgewiesen werden.

Auch in den Sekundärmetabolitprofilen der Kulturen mit den Kombinationen der A- oder AT-Domäne von PgnA mit der T-TE- oder TE-Domäne von AtrA_{At} (pEH52 und pEH63), AstA (pEH51 und pEH64), ApvA (pEH53 und pEH61) und BtyA (pEH120 und pEH62) konnte die Produktbildung in allen Kulturen beobachtet werden (Abbildung 4-43). Im Vergleich zu den Konstrukten mit der A-Domäne von ApvA sind jedoch niedrigere Produktionsausbeuten zu verzeichnen. Überdies kann auch in diesem Fall die TE-Domäne des Indolylpyruvat-verwendenden Enzyms AstA in beiden Kombinationen erfolgreich das durch die A-Domäne von PgnA aktivierte Phenylpyruvats zu dem erwarteten Benzochinon kondensieren. Wie auch in den vorhergehenden Konstrukten werden die Aryleinheit von der A-Domäne und die Kernstrukturen von der TE-Domäne bestimmt.

Nach erfolgreicher Rekombination von Phenyl- bzw. Hydroxyphenylpyruvat aktivierenden A- oder A/T-Domänen von ApvA und PgnA mit den T-TE- oder TE-Domänen anderer Enzyme, wurde eine Rekombination von der A-Domäne von AtqA und AstA mit den anderen Enzymen angestrebt. Entsprechend den anderen rekonstruierten Enzymen wurde die für die Substrataktivierung zuständige A-Domäne von AstA bzw. AtqA mit den TE-Domänen von AtrA_{At}, PgnA, ApvA und BtyA fusioniert, die für die Bildung der Kernstruktur maßgeblich sind. Die T-Domänen wurden von AtqA bzw. AstA oder ihren Gegenpartnern übernommen. Die in keiner Kultur, die die Konstrukte mit der TE-Domäne von AtrA_{At} oder ApvA exprimieren wurde das erwartete Molekül detektiert. In den Transformanten mit den TE-Domänen von PgnA und BtyA konnten hingegen in 5 der 8 untersuchten Kombinationen die gesuchten Substanzen gefunden werden (Abbildung 4-44 und Abbildung 4-45).

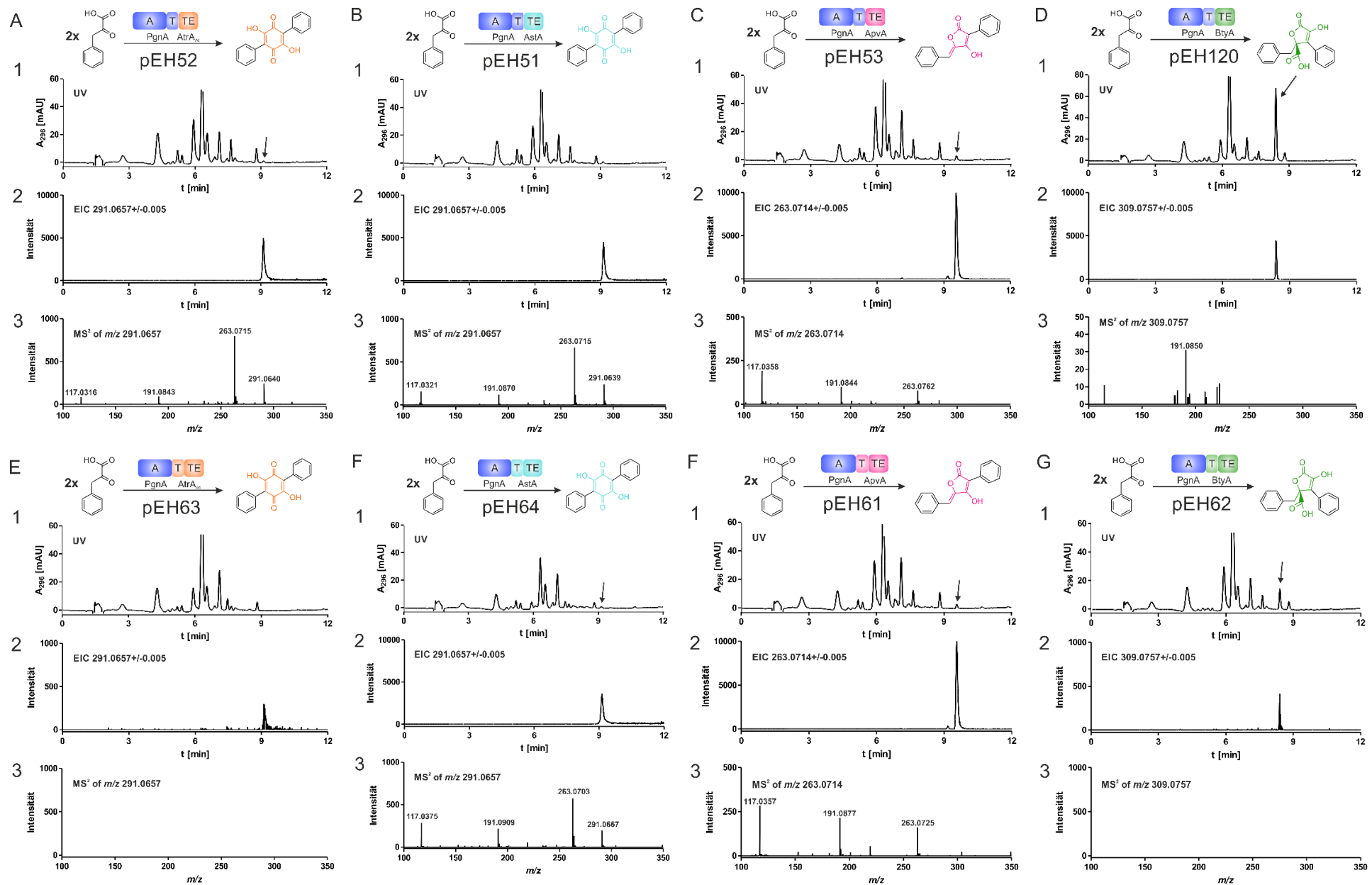


Abbildung 4-43: LC-MS Analytik der Metabolitenprofile von *S. cerevisiae* BJ5464_NpgA Kulturen, die Hyrid-Proteinen mit der A-Domäne von PgnA exprimieren. (1) Die Absorption bei 296 nm, (2) extrahierten Ionenchromatogramme und (3) Fragmentierungs-Muster von $[M + H]^+$ sind dargestellt.

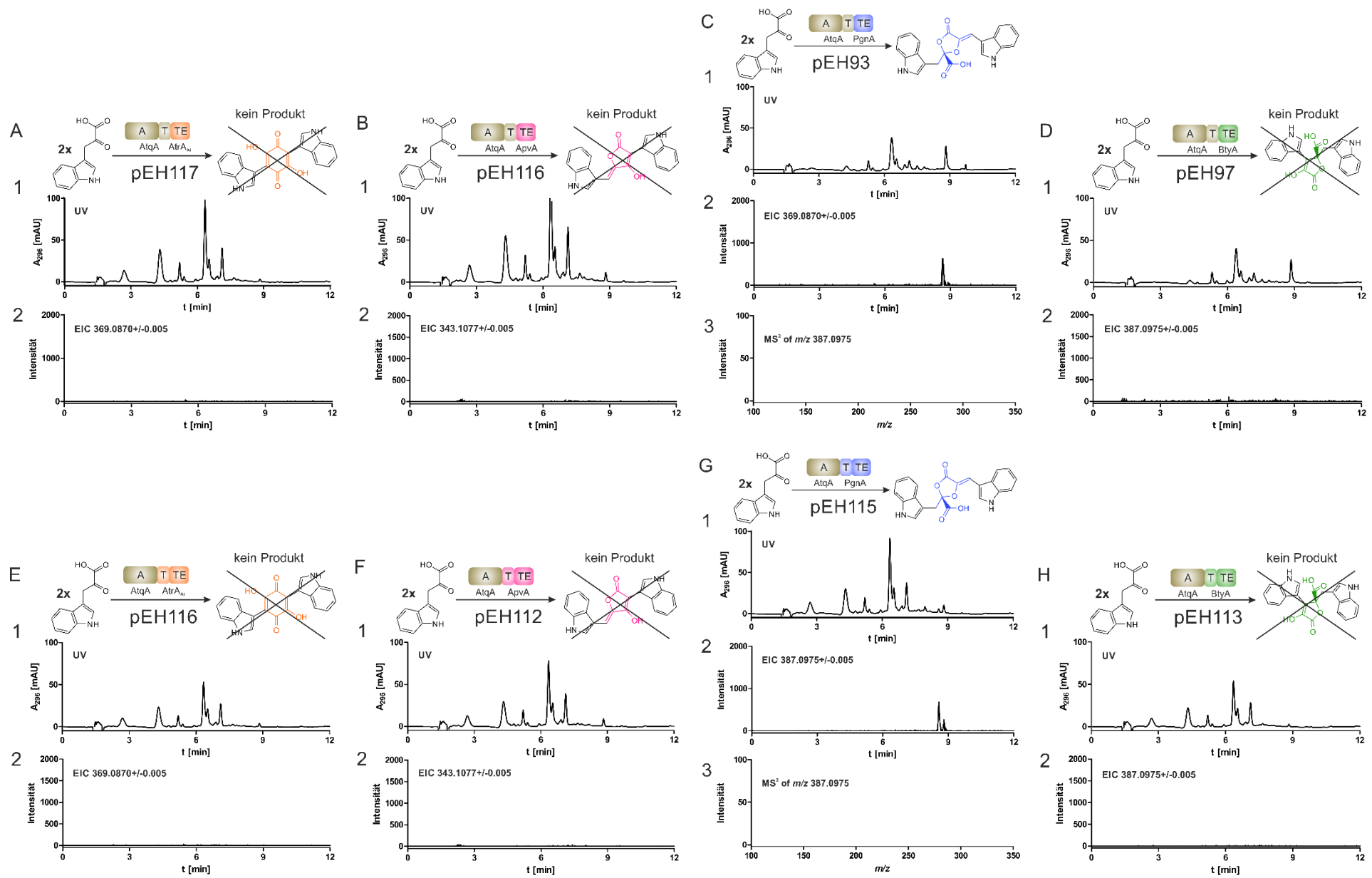


Abbildung 4-44: LC-MS Analytik der Metabolitenprofile von *S. cerevisiae* KO3 Kulturen, die Hyrid-Proteinen mit der A-Domäne von AtqA exprimieren. (1) Die Absorption bei 296 nm, (2) extrahierten Ionenchromatogramme und (3) Fragmentierungs-Muster von $[M + H]^+$ sind dargestellt.

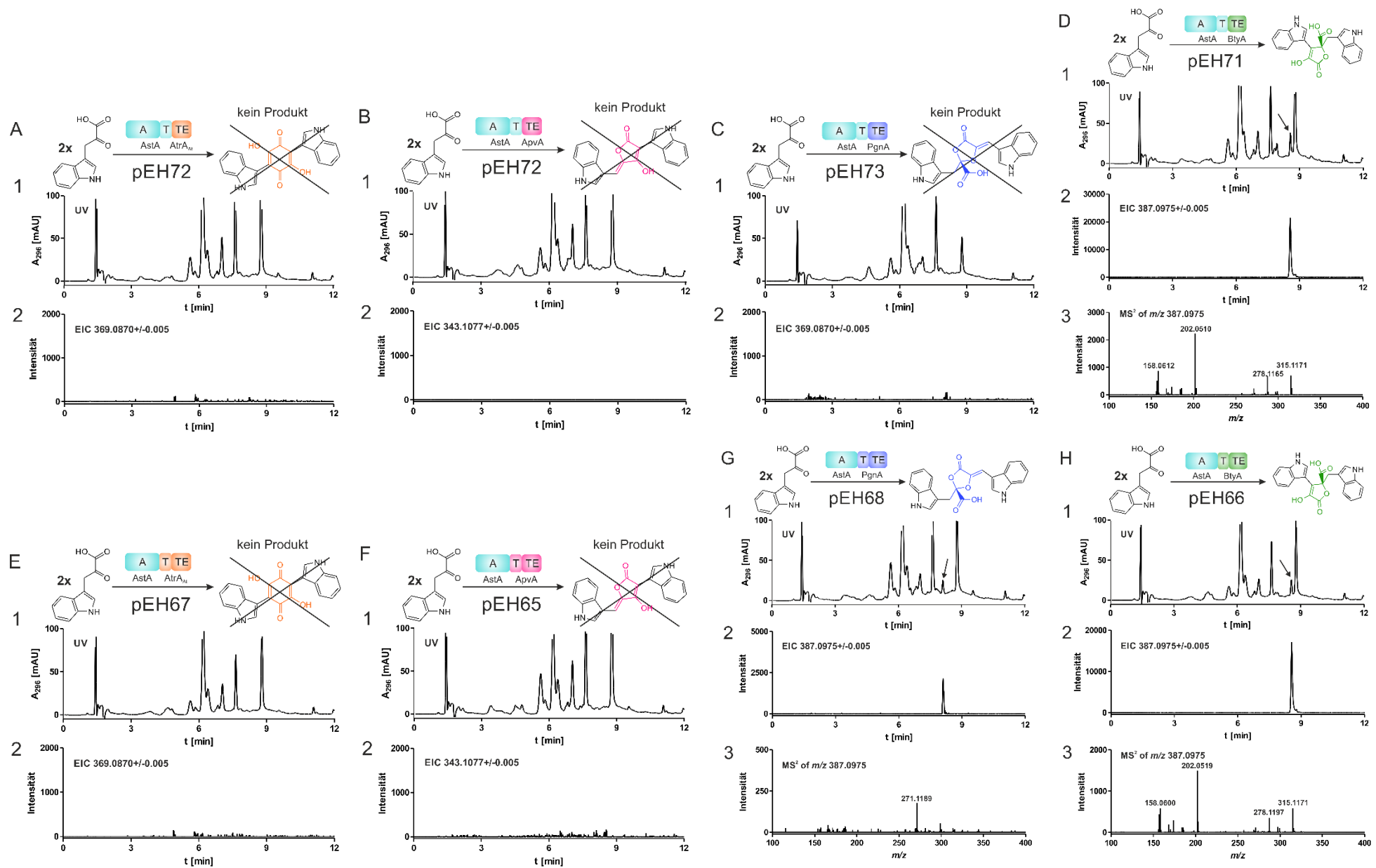


Abbildung 4-45: LC-MS Analytik der Metabolitenprofile von *S. cerevisiae* KO3 Kulturen, die Hyrid-Proteinen mit der A-Domäne von AstA exprimieren. (1) Die Absorption bei 296 nm, (2) extrahierten Ionenchromatogramme und (3) Fragmentierungs-Muster von $[M + H]^+$ sind dargestellt.

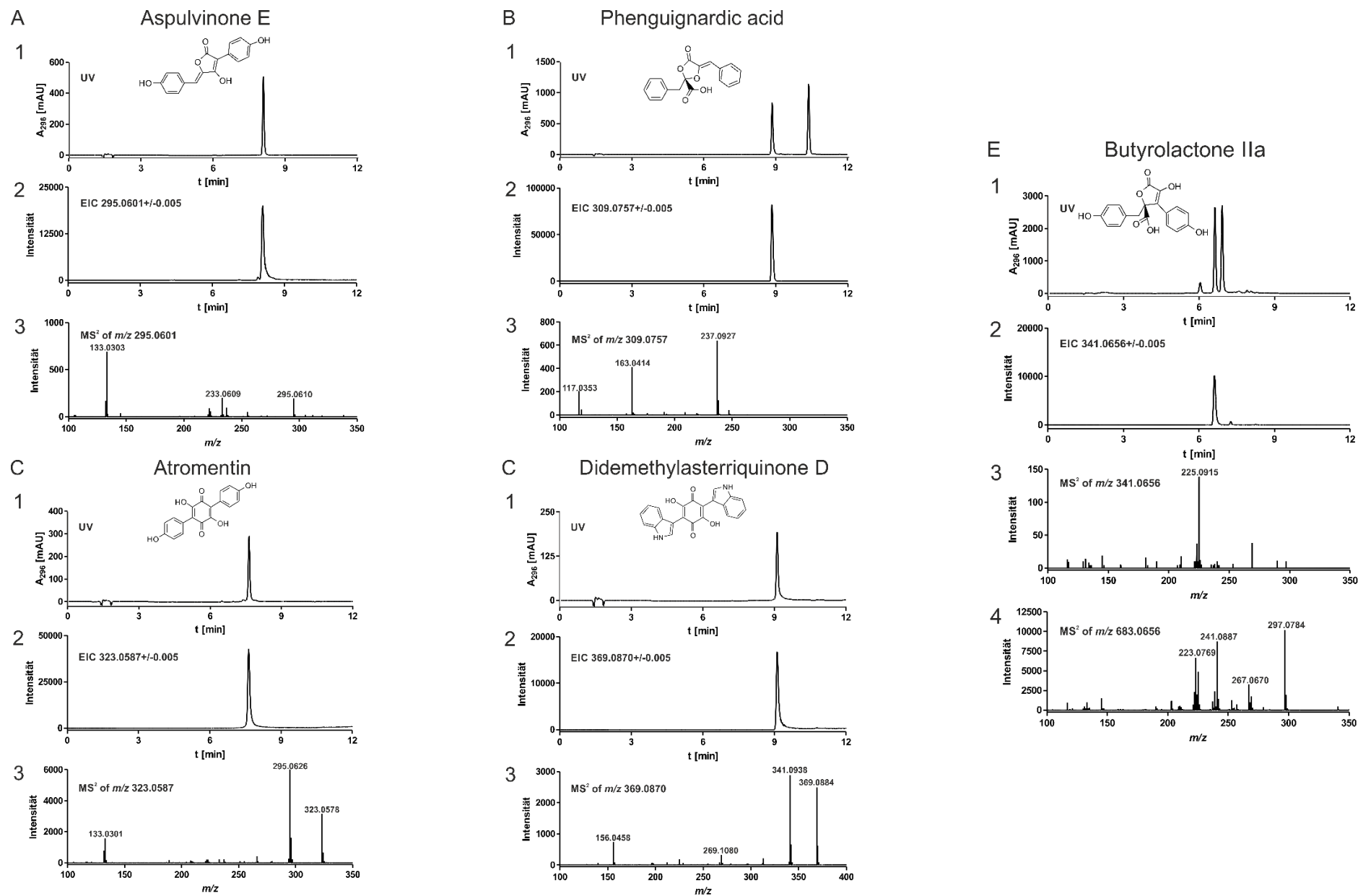


Abbildung 4-46: LC-MS Analytik der Metabolitenprofile von den Produkten der natürlichen NRPS-ähnlichen Enzyme. (1) Die Absorption bei 296 nm, (2) extrahierten Ionenchromatogramme und (3) Fragmentierungs-Muster von $[M + H]^+$ sind dargestellt.

4.1.7. Strukturaufklärung

Zur Strukturaufklärung der durch die rekombinanten NRPS-ähnlichen Enzyme generierten Produkte wurden die Sekundärmetabolite zunächst mittels LC-MS analysiert. Die gemessenen LC-HR-ESI-MS Daten entsprechen sehr gut den theoretischen $[M - H]^-$ bzw. $[2M - H]^-$ Ionen der erwarteten Substanzen (Tabelle 4-9). Anhand des Fragmentierungsmusters dieser Ionen ließen sich außerdem einige strukturelle Einheiten identifizieren. So entsprechen Fragmente von $m/z = 117.0354$ den theoretischen Massen eines Phenyl-Rests. Diese Fragmente sind in Aspulvionen E, Atromentin und Phenguignarsäure zu finden (Tabelle 4-9). Für Aspulvionen E und Atromentin sowie Phenylbutyrolactone IIa ist außerdem ein Fragment von $m/z = 191.084$ beobachtet worden. Die 4-Hydroxyphenyl-Guppen lassen sich anhand von den Fragmenten bei $m/z = 133.0304$ identifizieren (Tabelle 4-9). Butyrolactone IIa und Atromentin ließen sich aufgrund des Vergleiches von der Retentionszeit, dem UV-Spektrum, den $[M - H]^-$ -Ionen und dessen Fragmentierungsmusters mit einem authentischen Standard eindeutig identifizieren (Abbildung 4-46). Polyporsäure und Pulvinon sind bekannte Isolate aus Pilzen und wurden über die Auswertung der Fragmentierungsmuster der $[M - H]^-$ identifiziert (Cohen and Robinson 2001; Ojima et al. 1973; Sugiyama et al. 1979; Xu et al. 2013; Zhu et al. 2014). Da Pulvinon wie auch Aspulvinon E photosensitiv sein und eine Konformationsisomerie aufweisen sollte, wurden die Extrakte von den im Dunkeln angezogenen Kultur Licht ausgesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben gezogen und an der LC-MS vermessen. Wie erwartet, konnte die Umwandlung von Pulvinon zu Isopulvinon beobachtet werden (Abbildung 4-47).

Entsprechend der anderen Produkte der NRPS-ähnlichen Enzyme wurden die rekombinierten Produkte aus 5 l Kultur extrahiert. Aufgrund des großen Volumens der Proben wurden die Sekundärmetabolite zunächst über eine Sephadex Säule fraktioniert und die Produkte aus den entsprechenden Fraktionen mittels HPLC isoliert. Anhand der aufgenommenen ^1H -NMR-Spektren können die aromatischen Ringsysteme einfach unterschieden werden (Tabelle 4-10 und Abbildung 7-9 - Abbildung 7-12). Die fünf Protonen von Prenyl-Resten koppeln miteinander, was sich typischerweise als Signale für zwei Triplet und einem Duplett in den Spektren beobachten lässt. Ein AA'BB'-System aus vier Protonen ist charakteristisch für eine 4-Hydroxyphenyl-Gruppe. Wie schon erwähnt, lassen sich Indol-Einheiten anhand der Signale für die vier gekoppelten Protonen und Singulett bzw. einem Duplett für das mit dem NH des Indolrings koppelt leicht identifizieren (Liao et al. 2018; Pirrung et al. 2005). Lässt sich die Substanz in der Kernstruktur spiegeln, wie bei den Hydroxybenzochinonen, kann nur ein Set der Signale nachgewiesen werden.

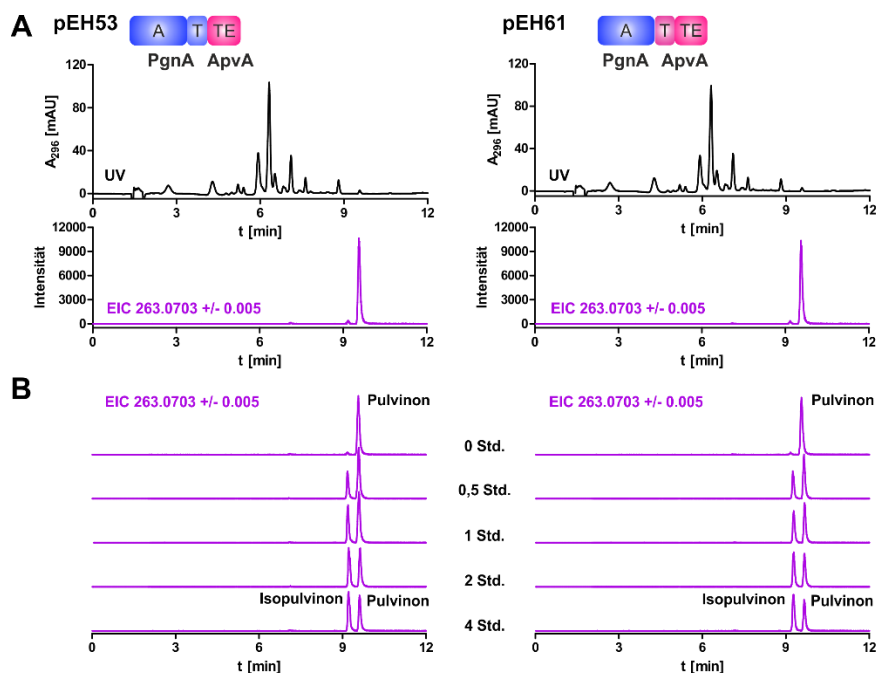
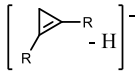


Abbildung 4-47: Zeitabhängige Umwandlung von Pulvinon zu Isopulvinon unter Belichtung. A) LC-MS Analyse der Ethylacetatextrakte der im Dunkeln angezogenen Kulturen die pEH53 bzw. pEH61 tragen. B) Analytik der Umwandlung im Extrakt anhand der $[M + H]^+$ -Ionen nach verschiedenen Belichtungsauern.

Für Hydroxyphenguignarsäure, Phenylbutyrolactone IIa, Indolguignarsäure und Indolbutyrolactone IIa wurden je zwei Sets an Signalen für die Aryl-Einheiten nachgewiesen (Tabelle 4-10). Die Kernstrukturen der vier Substanzen tragen zwei prochirale Methylenprotonen, die als zwei Dupletts mit Kopplungskonstanten von 14-16 Hz zu finden sind. Bei 6,23 bzw. 6,45 ppm erscheinen die Singulett von den olefinischen Protonen von den beiden Guignarsäuren. Die MS und NMR von Hydroxyphenguignarsäure und Phenylbutyrolactone entsprechen auch den in der Literatur gefundenen Daten (van Dijk et al. 2016; van Dijk and Wang 2018).

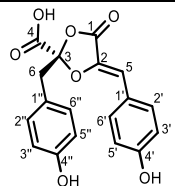
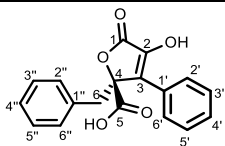
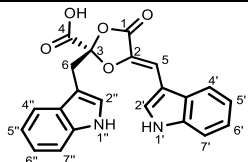
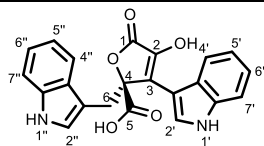
Zur Bestimmung der Stereochemie wurden Zirkulardichroismus-Spektren für die Butyrolactone und Guignarsäuren aufgenommen. Wie in Abbildung 7-2 und Abbildung 7-3 gezeigt, weisen Butyrolactone bzw. Guignarsäuren ähnliche Spektren auf.

Tabelle 4-9: LC-HR-ESI-MS Daten und beobachtete Fragmente der Produkte von den rekombinierten NRPS-ähnlichen Enzymen

Substanz	Chemische Formel	LC-HR-ESI-MS Daten [M - H] ⁻			MS2 of [M - H] ^{-a}			
		Kalkuliert	Gemessen	Abweichung (ppm)	[M - COH] ⁻		[C2OR - H] ⁻	
Phenguignarsäure	C ₁₈ H ₁₅ O ₅	309.0768	309.0790	-7.1	237.0927 ^b		117.0353	163.0414
Polyporsäure	C ₁₈ H ₁₂ O ₄	291.0663	291.0663	0.0	263.0715	191.0843	117.0316	
2 (5H)- Furanone	C ₁₇ H ₁₂ O ₃	263.0714	263.0720	-2,3		191.0844	117.0358	
Phenylbutyrolacton IIa	C ₁₈ H ₁₄ O ₅	309.0768	309.0770	-0.6		191.0850		
Aspulvinon E	C ₁₈ H ₁₂ O ₅	295.0612	295.0622	-3.4			133.0303	233.0609
Butyrolacton IIa	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	341.0667	341.0682	-4.4	267.0670 ^b	223.0769		297.0784 241.0887
Atromentin	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	323.0561	323.0555	1.9	295.0626		133.0301	
Hydroxyphenguignarsäure	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	341.0667	341.0660	2.1	269.0822 ^b		133.0341	179.0349
Didemethylasterriquinone D	C ₂₂ H ₁₄ N ₂ O ₄	369.0881	369.0884	-0,8	341.0938	269.1080	156.0458	
Indolguignarsäure	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O ₅	387.0986	387.0988	-0.5				271.1189
Indolbutyrolacton	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O ₅	387.0986	387.0985	0.3	315.1171 ^b		158.0612	278.1165 202.0510

^a: Butyrolacton IIa: [2M - H]⁻ anstatt [M - H]⁻^b: [M - COOH - CO]⁻

Tabelle 4-10: ¹H-NMR-Daten der Produkte, welche durch die rekombination der NRPS-ähnlichen Enzyme gebildet wurden

	Hydroxyphenguignarsäure	Phenylbutyrolacton	Indolguignarsäure	Indolbutyrolacton
				
Lsg-mittel	(CD ₃) ₂ SO	(CD ₃) ₂ CO	(CD ₃) ₂ SO	(CD ₃) ₂ CO
Position	δ _H , multi, J in Hz	δ _H , multi, J in Hz	δ _H , multi, J in Hz	δ _H , multi, J in Hz
5	6.23, s		6.45, s	
6	3.36, d, 14.7 3.41, d, 14.7	2.88, d, 14.1 2.90, d, 14.1	3.56, d, 15.6 3.61, d, 15.6	3.71, d, 15.3 3.81, d, 15.3
1'			11.57, s (NH)	10.87, s (NH)
2'	7.54, d, 8.7	7.86, d, 7.7	7.80, s ^b	7.86, s
3'	6.82, d, 8.7	7.52, t, 7.7		
4'	9.92, s (OH)	7.42, t, 7.4	7.79, d, 7.9 ^b	8.04, d, 8.0
5'	6.82, d, 8.7	7.52, t, 7.7	7.06, ddd, 8.0, 7.1, 0.9	6.97, ddd, 8.0, 7.2, 0.8
6'	7.54, d, 8.7	7.86, d, 7.7	7.154, ddd, 8.0, 7.1, 0.9 ^c	7.20, ddd, 8.0, 7.1, 0.8
7'			7.61, d, 7.9	7.31, d, 8.0
1''			10.84, s (NH)	9.99, s (NH)
2''	7.05, d, 8.6	6.86, d,	7.149, s ^c	6.78, s
3''	6.61, d, 8.6	7.132, t ^a		
4''	9.28, s (OH)	7.128, t ^a	7.43, d, 8.0	7.51, d, 8.1
5''	6.61, d, 8.6	7.132, t ^a	6.89, ddd, 7.9, 7.0, 0.8	6.80, ddd, 7.8, 7.1, 0.7
6''	7.05, d, 8.6	6.86, d,	6.99, ddd, 7.9, 7.1, 0.9	7.06, ddd, 7.8, 7.3, 0.6
7''			7.27, d, 8.0	7.27, d, 8.0

a, b, c Signale mit den gleichen Buchstaben überlappen miteinander

Die Daten stimmen mit denen aus der Literatur für Hydroxyphenguignarsäure (van Dijk and Wang 2018) und Phenylbutyrolacton (van Dijk et al. 2016) überein.

4.2. Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus *Aspergillus terreus* und *Chaetomium globosum*

4.2.1. Einleitung

Meist sind die durch NRPS oder PKS synthetisierten Strukturen Grundgerüste, die durch nachfolgende Modifikationen erst ihre endgültige Struktur erhalten. Oftmals beeinflussen diese Veränderungen die biologische Aktivität im Vergleich zu den nicht modifizierten Vorläufern (Wollinsky et al. 2012). Auch in der genetischen Umgebung von den NRPS-ähnlichen Gene findet sich eine Reihe von solchen Modifikations-Enzymen (Tabelle 4-11). Neben Methylierungen finden sich an Sekundärmetaboliten, deren Vorläufer auf durch NRPS-ähnlichen Enzyme synthetisiert werden häufig Prenylierungen, die weitergehend zyklisiert oder oxidiert sein können (Guo et al. 2013a).

Tabelle 4-11: Modifikationsenzyme in der näheren genetischen Umgebung der NRPS-ähnlichen Gene

Gen	Protein	(putative) Funktion
ATEG_00700	AtqA	NRPS-ähnlich (A/T/TE)
ATEG_00701	EAU39347	Zinkabhängige Alkoholdehydrogenase
ATEG_00702	EAU39348	Aromatische Prenyltransferase (DMATS)
ATEG_00703	EAU39349	O-Methyltransferase
ATEG_02815	BtyA	NRPS-ähnlich (A/T/TE)
ATEG_02816	BtyB	O-Methyltransferase
ATEG_02818	EAU36092	O-Methyltransferase
ATEG_02819	EAU36093	Aminotransferase
ATEG_02820	EAU36094	Cytochrome P450
ATEG_02823	EAU36097	Aromatische Prenyltransferase (DMATS)
ATEG_03090	AtrA _{At}	NRPS-ähnlich (A/T/TE)
ATEG_03091	EAU36365	O-Methyltransferase
ATEG_03092	EAU36366	Aromatische Prenyltransferase (DMATS)
ATEG_08899	PgnA	NRPS-ähnlich (A/T/TE)
ATEG_08901	EAU31033	P450
ATEG_08902	EAU31033	P450
CHGG_03684	EAQ91749	Aromatische Prenyltransferase (DMATS)
CHGG_03685	EAQ91750	Zinkabhängige Alkoholdehydrogenase
CHGG_03686	EAQ91751	Aminotransferase
CHGG_03687	AstA	NRPS-ähnlich (A/T/TE)

Anhand von BLAST-Analysen wurden im Genom von *A. terreus* zehn putative Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie identifiziert (Khaldi et al. 2010). Durch biochemische Untersuchungen über rekombinante Proteine oder deren Orthologe wurden bereits fünf der Proteine charakterisiert, die jedoch nicht in Clustern der NRPS-ähnlichen Gene liegen. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass AstPT (ATEG_09980) die

Prenylierung methylierter Asterrichinone katalysiert (Tarcz et al. 2014a), für welche Diedemethyl-asterrichinone D das Grundgerüst bildet.

In vier Clustern von den NRPS-ähnlichen Genen wurden putative Prenyltransferasen vorhergesagt (Tabelle 4-11). Dabei scheinen ATEG_00702, ATEG_03092 und CHGG_03684 für die Prenylierung von Benzochinonen und ATEG_02823 für die Prenylierung von Butyrolactonen verantwortlich zu sein. Interessanter Weise konnte im Cluster von *apvA* keine Prenyltransferasen identifiziert werden, obwohl die meisten der aus *A. terreus* isolierten Aspulvinone eine oder mehrere Prenyl-Gruppen tragen (Guo et al. 2013a; Ojima et al. 1975). Anhand von Deletionsexperimente und Bestimmung der Expressionslevel konnte *apbA* (ATEG_01730) als Prenyltransferase für sowohl die Aspulvinone als auch Butyrolactone identifiziert werden (Guo et al. 2015; van Dijk and Wang 2018).

Für eine Ko-Expression von den NRPS-ähnlichen Enzymen und den Prenyltransferasen in *S. cerevisiae* sollten die Prenyltransferasegene in die MCS2 der pESC-Vektoren kloniert werden.

4.2.2. Klonierung

Das Prenyltransferasegen *apbA* war bereits von Herrn Alexander Frehse in die MCS2 des pESC-HIS-Vektor (pAF19) eingebracht worden und konnte für eine Co-Transformation mit beispielsweise pEH10 oder pEH29 eingesetzt werden. Da eine Co-Transformation von zwei Vektoren in deutlich weniger positiven Tranformanten resultiert, sollten beide Gene von einen Vektor exprimiert werden. Die MCS2 des pEH10 Vektors wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SpeI* geöffnet. Die *apbB* Sequenz wurden mit den Primern pESC-MCS2-f1 und pESC-MCS2-r1 amplifiziert, das Fragment durch Ethanol-fällung aufgereinigt und mittels homologer Rekombination in *E. coli* in den geöffneten pEH10 Vektor eingebracht. Das aus der Klonierung resultierende pEH23 Konstrukt wurde mit PvuII verdaut und schließlich sequenziert. Die Vektorkarte und das Agarosegel des Kontrollverdaus sind in Abbildung 4-48 zu sehen.

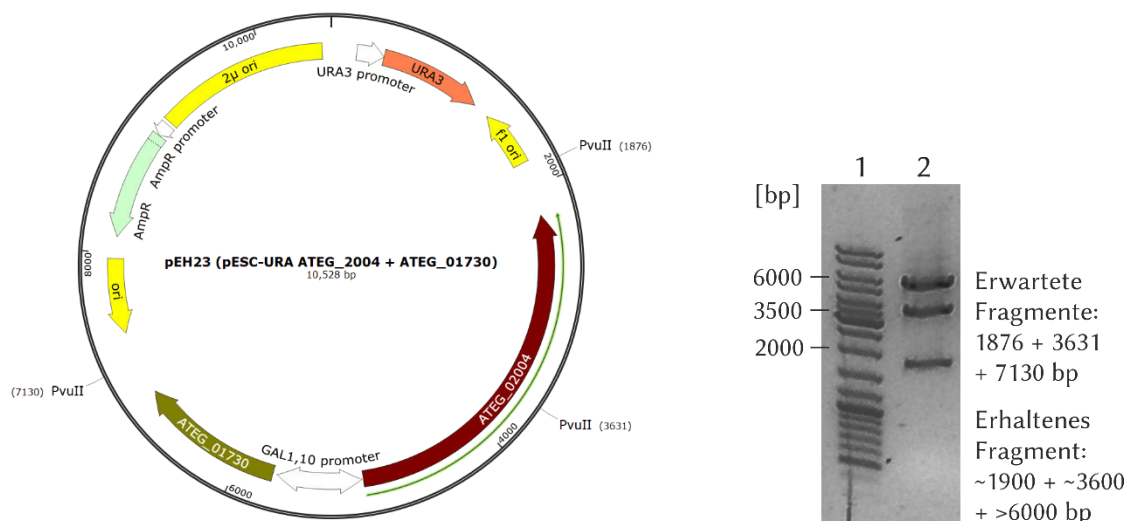


Abbildung 4-48: Vektorkarte von pEH23 (ATEG_02004 in der MCS1 und ATEG_01730 in der MCS2 von pESC-URA) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH23 mit PvuII verdaut.

Die Prenyltransferasen ATEG_00702, ATEG_02823, ATEG_03092 und CHGG_03684 sollten aus cDNA amplifiziert werden, um die Gen-Struktur zu bestätigen. Allerdings konnten die Prenyltransferase Gene nicht von cDNA amplifiziert werden, obwohl eine parallel durchgeführte PCR-Amplifikation der NRPS-ähnlichen Gene problemlos möglich war. Daher wurden die Gene zunächst von gDNA amplifiziert und in den pGemT® easy Vektor ligiert, um die in der NCBI-Datenbank hinterlegten Gen-Annotationen zu überprüfen. Nachdem die Sequenzierung bestätigt worden war, wurden die Exons mit den entsprechenden Primern amplifiziert, über Homologe Rekombination miteinander verbunden und in den pESC-HIS-Vektor eingefügt (Tabelle 4-12). Beispielhaft ist in Abbildung 4-49 die Vektorkarte von pEH83 und das zugehörige Agarosegel abgebildet.

Tabelle 4-12: Übersicht über die Prenyltransferasen exprimierenden Konstrukte und zu deren Herstellung verwendeten Primer

Gen	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Plasmid
ATEG_00702	0702_1_fwd; ATEG_00702_2	ATEG_00702_3; ATEG_00702_4	ATEG_00702_5; 0702_2_rvs	pEH82
ATEG_02823	2823_1_fwd; CAW_02823-3	CAW_02823-2; 2823_2_rvs		pEH83
ATEG_3092	3092_1_fwd; ATEG1.1	ATEG1.2; 3092_2_rvs		pEH84
CHGG_03684	3684_1_fwd; CHGG_03684_fus_1	CHGG_03684_fus_2; CHGG_03684_fus_3	CHGG_03684_fus_4; 3684_2_rvs	pEH86

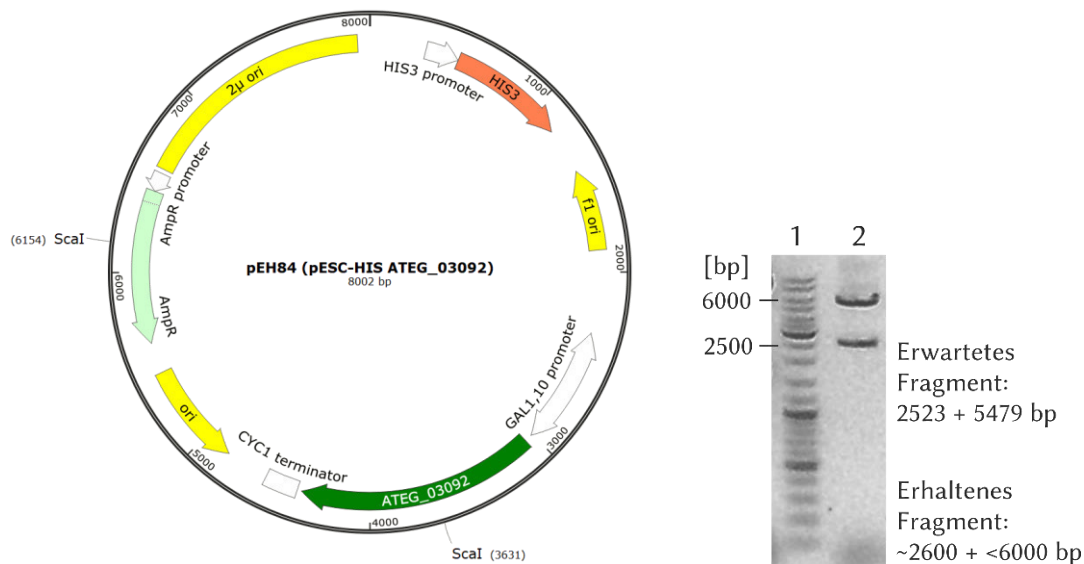


Abbildung 4-49: Vektorkarte von pEH84 (ATEG_03092 in pESC-HIS) und 1%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. 1: DNA-Größenstandard; 2: pEH84 mit *ScaI* verdaut.

4.2.3. Co-Transformation von NPRS-ähnlichen mit Prenyltransferasen

Die Prenyltransferase exprimierenden Plasmide wurden mit dem zugehörigen Plasmiden für die NRPS-ähnliche Gene in den *S. cerevisiae* Stamm KO3 transformiert. Nach 48 stündiger Kultivierung in SC-URA-HIS Medium mit 2 % Galaktose wurden die Sekundärmetabolite extrahiert und an der LC-MS analysiert. Wie in Abbildung 4-50 zu sehen, konnten für vier der NRPS-ähnlichen Enzyme die zugehörigen Produkte Aspulvinon E, Butyrolacton IIa und Atromentin einwandfrei nachgewiesen werden. DDAQ D konnte aber weder in den pEH91 noch in den pEH55 tragenden Transformanten detektiert werden (nicht gezeigt).

Die prenylierten Strukturen konnten jedoch in keinem Ethylacetatextrakt der getesteten Co-Transformationen gefunden werden (Abbildung 4-50 graues Spektrum). Auch die Suche nach eventuell zweifach prenylierten Grundstrukturen blieb ergebnislos (Abbildung 4-50 türkises Spektrum).

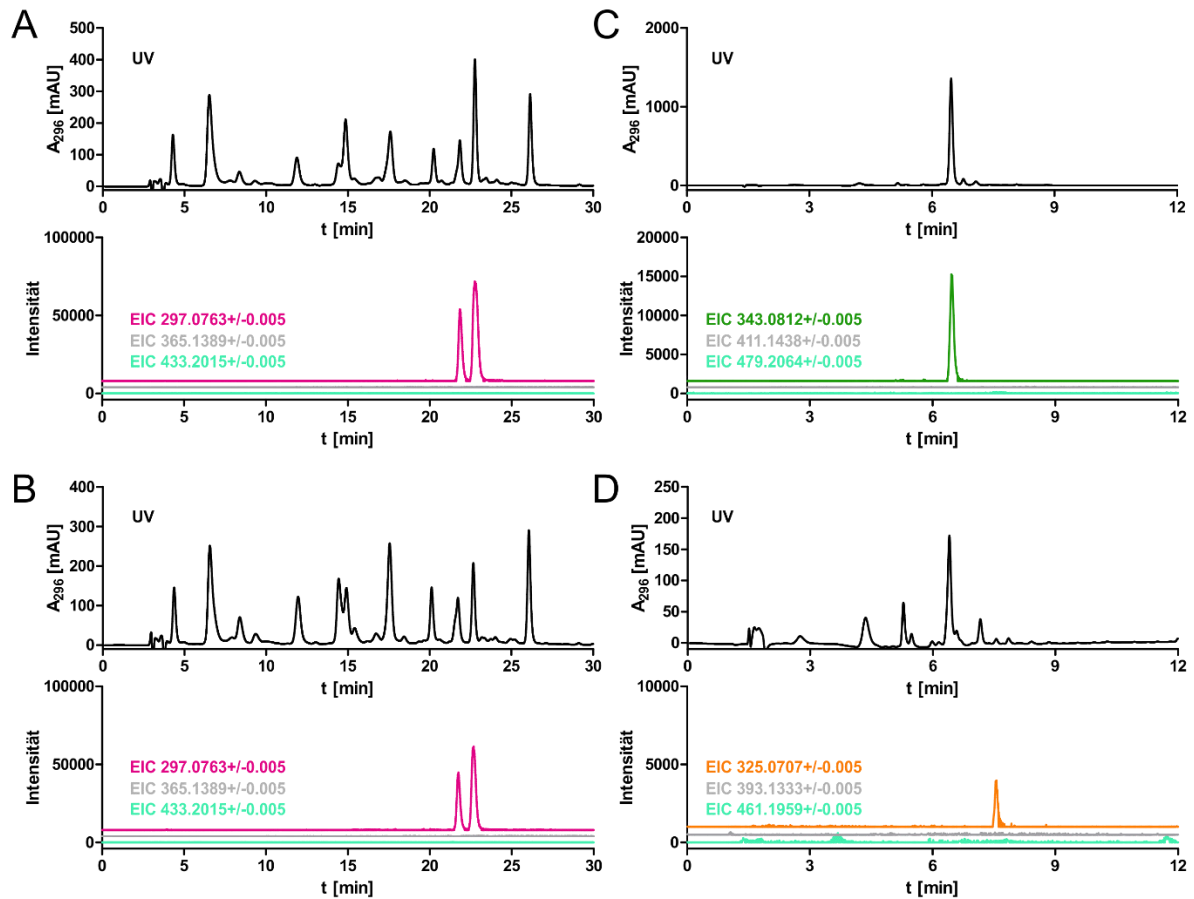


Abbildung 4-50: LC-MS Analyse der Ethylacetatextrakte von NRPS-ähnlichen Genen und Prenyltransferasen co-exprimierenden *S. cerevisiae* KO3 Kulturen 48 Stunden nach der Induktion. A) pEH23, B) pEH10 + pAF19, C) pEH41 pEH83 und D) pEH55 + pEH84 tragende Transformanten. Die UV-Spektren von 296 nm sind in schwarz und die zu den Produkten gehörigen Chromatogramme der $[M + H]^+$ Ionen sind in Farbe abgebildet. Pink) Aspulvinon E; grün) Butyrolacton; orange) Atromentin; grau) einfach prenyliert; türkis) zweifach prenyliert.

5. Diskussion

5.1. Untersuchungen zu putativen NRPS-ähnlichen Genen aus *A. terreus* und *C. globosum*

5.1.1. Expressionsversuche von putativen NRPS-ähnlichen Genen mit eigenem Promotor- und Terminatorberiche aus *A. terreus* in *A. nidulans*

Das Projekt wurde für die Expression der sechs NRPS-ähnlichen Gene *apvA* (ATEG_02004), *melA* (ATEG_03563), *atqA* (ATEG_00700), *btyA* (ATEG_02815), *pgnA* (ATEG_08899) und *atrA_{At}* (ATEG_03090) aus dem Stamm *A. terreus* A1156 in den Stamm *A. nidulans* TN02A7 angelegt. Die Hauptaufgaben bestanden in der Herstellung eines Transformations- bzw. Expressionskonstruktes mit dem nativen Promotor und Terminator, wenn noch nicht vorhanden, und die anschließende Einbringung in den *A. nidulans* Stamm TN02A7 mittels Ca^{2+} -PEG-vermittelter Transformation von Protoplasten. Durch die Extraktion der Sekundärmetabolite aus den erhaltenen Transformanten und deren Analyse sollten zusätzlich erhaltene Sekundärmetabolite identifiziert und ihre Struktur aufgekärt werden.

Die durch die sechs NRPS-ähnlichen Gene gebildeten Enzyme besitzen, mit Ausnahme von *AtrA_{At}* nach bioinformatischen Analysen eine A-T-TE Struktur (Guo and Wang 2014). Ein Vergleich der sechs NRPS-ähnlichen Enzyme zeigte eine hohe Sequenzidentität auf Aminosäureebene von 39%-49% zwischen den meisten Enzymen, wobei die Ähnlichkeit zwischen *ApvA* und *MelA* mit 66% deutlich hervorstach (Tabelle 7-2). Die hohe Sequenzidentität ließ vermuten, dass das gleiche Produkt durch die beiden Enzyme synthetisiert wird. In einer Deletionsstudie von 2013 konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Aspulvinon E durch *ApvA* katalysiert wird und dass *MelA* an der Pigmentsynthese in den Konidiosporen beteiligt ist (Guo et al. 2013b). Die Kolonien von *A. terreus* weisen im Gegensatz zu den meisten anderen grünen bis bräunlichen *Aspergillus* Arten eine zimtfarbene bis ockergelbe Färbung auf. Somit ist durchaus denkbar, dass sich ein unabhängiger Mechanismus entwickelt hat, um das für den UV-Schutz wichtige Pigment Melanin zu synthetisieren, der nicht auf dem meist in Pilzen gefundenen 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN) oder dem seltener verwendeten L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-dopa) als Intermediat beruhen (Eisenman and Casadevall 2012). Auf Grund der hohen Sequenzidentität zwischen *ApvA* und *MelA* ist es möglich, dass Aspulvinone E als ein Grundbaustein des *A. terreus* Pigments verwendet wird.

Das putative NRPS-ähnliche Enzym AtrA_{At} wies nach den Sequenzanalysen lediglich eine A-T-Domänenstruktur auf. Durch einen Vergleich seiner Sequenz auf Aminosäureebene wurde eine Homologie von 54% zu ApvA bzw. von 55% zu MelA berechnet. Daher wurde vermutet, dass AtrA_{At} wie auch ApvA und MelA 4-Hydroxyphenylpyruvat als Substrat verwendet

Die Expressionskonstrukte für ApvA, MelA und AtrA_{At} mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz lagen in der Arbeitsgruppe bereits vor. Der Sequenzbereich für *pgnA* wurde im Laufe dieser Arbeit ebenfalls in den Expressionsvektor pJW24 überführt. Die Sequenzen für MelA und AtrA_{At} wurden erfolgreich Mittels ektopischer Integration in das Genom von dem *A. nidulans* Stamm TN02A7 eingebracht. So konnten die Sekundärmetabolite von vier Transformanten für MelA und fünf Transformanten von AtrA_{At} analysiert werden. Leider konnte in keinem der Transformanten zusätzliche Sekundärmetabolite nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden 15 Transformanten für MelA auf Grundlage von dem *A. nidulans* Stamm GR5 bestätigt. Da dem GR5 Stamm das für die Melanin-Synthese verantwortliche *wA3* Gen fehlt, sind die Kolonien weiß. Demnach sollten bei der Expression von MelA, wenn die Hypothese der Produktion von Aspulvinon E korrekt ist, die Kolonien gelb gefärbt sein. Leider wurde jedoch selbst bei einer genauen Analyse der Kulturen im Vergleich mit dem Wildtyp keine Produktion von Sekundärmetaboliten nachgewiesen. Für die Konstrukte von ApvA und PgnA wurde im Verlauf dieser Arbeit keine Transformanten hergestellt, da vermutet wurde, dass vor allem die Verwendung der eigenen Promotoren eine Expression in *A. nidulans* sehr erschwert. Daher sollte der *gpdA*-Promotor, ein starker, konstitutiver *Aspergillus*-Promotor und der weitläufig etablierte *trpC*-Terminator, für den weiteren Versuchsaufbau verwendet werden. Sowohl der Promotor als auch die Gene konnten in einer PCR mit Sequenzüberhängen amplifiziert werden, die eine Fusion des Promotors mit dem Gen mit Hilfe von einer Fusions-PCR ermöglicht. Leider konnten auch nach mehreren Versuchen die beiden Sequenzabschnitte nicht miteinander verbunden werden.

In später veröffentlichten Studien wurde die Synthese von Aspulvinon E durch ApvA bzw. MelA tatsächlich mittels einer Überexpression beider Proteine in *A. nidulans* bestätigt (Guo et al. 2015). Des Weiteren wurde anhand einer Fusion des jeweiligen Proteins mit Gfp (*green fluorescent protein*) beobachtet, dass MelA in den Konidiosporen aktiv ist und wahrscheinlich einen Baustein für Asp-Melanin liefert, wohingegen ApvA im Mycel aktiv ist und das Grundgerüst für verschiedene Aspulvinone liefert (Geib et al. 2016). Auch für BtyA konnte an Hand von einer Überexpression in *A. nidulans* die Synthese von Butyrolactone IIa bestätigt werden (van Dijk et al. 2016). Das Syntheseprodukt von PgnA wurde nicht durch

einen allgemein gebräuchlichen *Aspergillus* Promotor identifiziert. Erst mit Hilfe des *Tet-on* Expressionssystems wurde Phenguignarsäure als Produkt von PgnA identifiziert (Sun et al. 2016).

5.1.2. Expression von putativen NRPS-ähnlichen Genen in *Saccharomyces cerevisiae*

Aspergillus als Expressionssystem bietet einige Vorteile. Es sollte ein alternatives Expressionssystem geschaffen werden, welches in kurzer Zeit eine einfache und zuverlässige Identifizierung von Genprodukten ermöglicht. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird in der Industrie vielfach für die Erzeugung von hochwertigen Metaboliten eingesetzt (Dai et al. 2015) und ist einer der am Besten untersuchten einzelligen Eukaryoten. Seine anspruchslosen Kultivierungsbedingungen und umfangreichen Methoden zur genetischen Modifikation (Fletcher et al. 2016; Lian et al. 2018)

Neben den zuvor bereits erwähnten sechs NRPS-ähnlichen Genen aus *A. terreus* sollte des Weiteren das Gen *astA* (CHGG_03687) aus *C. globosum* in dem *S. cerevisiae* Stamm BJ5464_NpgA exprimiert werden. Die Enzymprodukte sollten aus den Kulturen extrahiert und die Struktur aufgeklärt werden. Da BJ5464_NpgA eine Deletion in dem *trp1* Gen der Tryptophan-Biosynthese besitzt, konnte dieser für die Expression von *astA* und *atqA*, welche aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität zu TdiA und einer Deletionstudie aus 2013 wahrscheinlich Indolyl-3-Pyruvat als Substrat aktivieren (Guo et al. 2013a) nicht verwendet werden. In Kooperation von Dr. Katja Backhaus, Johanna Schäfer und Kristin Öqvist wurde der Hefestamm KO3 hergestellt. Der neue Hefestamm beruht auf dem Stamm KAB26, der Tryptophan überproduziert (Backhaus et al. 2017). In KAB26 wurde das *npgA* Gen unter der Kontrolle des TDH3 Promotors und des ACT1-Terminators in den Genloкус von *pep4* eingefügt (Ammerer et al. 1986; McAlister and Holland 1985). Des Weiteren wurde das für die Serin Proteinase kodierende Gen *prb1* deletiert, um so die Konzentration an NRPS-ähnlichen Enzymen und folglich die Produktion der gesuchten Metabolite zu steigern (Tabelle 3-6) (Zubenko and Jones 1979).

Die sieben NRPS-ähnlichen Gene wurden aus der cDNA oder gDNA des entsprechenden Ascomyceten amplifiziert und in den Expressionsvektor pESC-URA kloniert. Durch die anschließende Sequenzierung wurden, bis auf in der Sequenz von *atqA*, in allen NRPS-ähnlichen Genen Abweichungen zu den in NCBI-Datenbank hinterlegten Annotierung identifiziert. Die Sequenzunterschiede konnten anhand von mindestens zwei vollständig unabhängigen Klonierungen bestätigt werden und können im Anhang in Tabelle 7-1

eingesehen werden. Für *atrA_{At}* wurde durch die Deletion einer Base der Leserahmen verschoben wodurch ein 76 Aminosäuren längeres Peptid besteht. Die 920 AS lange Peptidkette besitzt nach der bioinformatischen Analyse nun ebenfalls eine A-T-TE Domänenstruktur. Alle Gene bestehen nur aus einem Exon und die daraus resultierenden Peptidketten der sieben NRPS-ähnlichen Enzyme werden aus 920 bis 961 Aminosäuren zusammengesetzt.

Die Produktbildung wurde in allen Transformanten der sieben NRPS-ähnlichen Gene nachgewiesen und die Identität dieser Produkte wurde durch NMR- und MS-Analysen nach Isolierung aus den Hefekulturen bestätigt. In den Sekundärmetabolitprofilen der Transformanten von ApvA, BtyA und PgnA stellen von Butyrolacton IIa mit bis zu 35 mg/l, Aspulvinon E mit bis zu 13 mg/l bzw. Phenguignardsäure mit bis zu 15 mg/l nach 120 Std. Kultivierung die dominanten Produkte der Hefekulturen dar.

In den Kulturen die ApvA oder Mela exprimierten, wurden zwei Metabolite detektiert, die als Aspulvinon E und sein Isomer Isoaspulvinon E identifiziert werden konnten. Durch eine Kultivierung der Transformanten unter Lichtausschluss haben wir dargelegt, dass Aspulvinon E das Produkt dieser beiden Enzyme ist und die Isomerisierung durch Sonnenlicht induziert wird. Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse bestätigen, dass die Produkte der vier bekannten Enzyme ApvA, Mela, BtyA und PgnA mit denen identisch sind, die beim naiven Produzenten oder bei den heterologen *Aspergillus*-Wirten nachgewiesen wurden (Geib et al. 2016; Guo et al. 2013; Guo et al. 2015; Sun et al. 2016), was darauf hinweist, dass Produkte dieser NRPS-ähnlichen Enzyme durch die Hefeenzyme nicht weiter umgewandelt wurden. Der Nachweis der gleichen Metabolite spricht zudem für die metabolische Stabilität der erhaltenen Produkte, welches eine grundlegende Voraussetzung für eine weitere Umsetzung durch zusätzliche Modifikationsenzyme, wie Cytochrom P450-Enzyme oder Prenyltransferasen darstellt.

AtqA und AstA weisen eine Sequenzidentität von 70% zueinander und 66% bzw. 68% zu TdiA einer bekannten DDAQ D-Synthase aus *A. nidulans* auf. Die Expression von AtqA und AstA in dem *S. cerevisiae* Stamm KO3 bestätigte die Bildung von DDAQ D in den beiden Transformanten. Nach 48Std. konnten 2,4 mg/l des Metabolites aus den Kulturen gewonnen werden. Diese bisher beschriebenen Verbindungen sind Vorläufer bekannter biologisch aktiver Metaboliten aus Ascomyceten (da Silva et al. 2017; Dewi et al. 2015; Li 2010; Rao et al. 2000; Schneider et al. 2007) und werden bis aus Phenguignardsäure durch nachfolgende Enzyme modifiziert (Sun et al. 2016).

Für das bis zu dieser Arbeit noch nicht charakterisierte NRPS-ähnliche Gen *atrA_{At}*, konnte die Bildung von Atromentin beobachtet werden. Durch die von *AtrA_{At}* katalysierte

Dimerisierung von 4-Hydroxyphenylpyruvat wird Benzochinon als Kernstruktur von Atromentin gebildet. Nach unserem besten Wissen ist dies der erste Bericht über eine Atromentinsynthetase in Ascomyceten. Der Benzochinonring findet sich in dem von AtqA bzw. AstA aus *C. globosum* synthetisierten DDAQ D wider. Die Sequenzidentität von AtrA_{At} zu AtqA und AstA beträgt jedoch nur 44% bzw. 46% und ist damit deutlich niedriger als die 56% von AtrA_{At} mit ApvA, welches für die Bildung einem Produkt mit unterschiedlichen Strukturkern verantwortlich ist. Beispiele für die Dimerisierung von Hydroxyphenylpyruvat zu Atromentin durch NRPS-ähnliche Enzyme lassen sich dennoch in Basidiomyceten finden. So wird die Bildung von Atromentin in *Suillus grevillei* durch GreA, in *Paxillus involutus* durch die Enzyme InvA1, InvA2 und InvA5 und in *Tapinella panuoides* mit Hilfe von AtrA katalysiert. Deren Polypeptidketten bestehen aus 953 bis 957 Aminosäuren (Braesel et al. 2015; Schneider et al. 2008; Wackler et al. 2012) und weisen lediglich eine Sequenzidentität von etwa 37% zu dem 920 Aminosäuren langen Peptid von AtrA_{At} auf (Tabelle 7-3). In *Streptomyces rapamycinicus* findet sich das NRPS-ähnliche Enzym EchA, welches zur Herstellung von Polyporsäure zwei Phenylpyruvatmoleküle aktiviert und diese über den gleichen Benzochinonkern wie Atromentin verbindet (Zhu et al. 2014). Für AtrA_{At} und EchA wurde eine Sequenzidentität von 39% berechnet (Tabelle 7-3), die mit denen von AtrA_{At} mit verschiedenen Atromentinsynthetasen aus Basidiomyceten vergleichbar ist (Tabelle 7-3). Ein Vergleich der TE-Domänen zeigte sich, dass AtrA_{At} als auch AtqA und AstA die katalytische Triade aus einem Serin, Asparagin und einem Histidin besitzen, die nach einer Hypothese aus 2015 für die Formierung von Benzochinon als Strukturkern verantwortlich ist (Abbildung 7-1) (Braesel et al. 2015). Für die Bildung von anderen Strukturkernen sollte nach dieser Studie die Triade statt einem Asparagin eine Asparaginsäure enthalten. Für BtyA und PgnA trifft diese These zu aber in ApvA und MelA wurde die für Chinonsynthasen typische Ser, Asn, His Dreiergruppe gefunden (Abbildung 7-1). Diese Ergebnisse liefern ein hervorragendes Beispiel dafür, dass die Sequenzanalysen einen Hinweis auf die Funktion liefern können, die Genfunktion jedoch nach wie vor experimentell nachgewiesen werden sollte.

Die in diesen Experimenten ausgewählten sieben NRPS-ähnliche Gene, die für Enzyme mit einer A-T-TE-Architektur kodieren, wurden erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert. Die identifizierten Metabolite stimmen mit den in anderen Studien detektierten Substanzen überein. Die Grundstruktur wurde also nicht durch Wirtsenzyme verändert. Daher bietet diese Studie eine praktische Plattform für den funktionellen Nachweis von NRPS-ähnlichen Genen.

Frühere Studien weisen darauf hin, dass die meisten Produkte der NRPS-ähnlichen Enzyme Grundgerüste für vielfältige biologisch aktive Sekundärmetabolite darstellen, die durch nachfolgende Enzyme gebildet werden (Balibar et al. 2007; Guo et al. 2013a; Guo et al.

2015; Guo and Wang 2014). Diese von den NRPS-ähnlichen Enzyme gebildeten Grundgerüste können auch in dem in dieser Arbeit ausgewählten Expressionssystem modifiziert werden, indem Gene, die für maßgeschneiderte Enzyme wie Prenyltransferasen (Winkelblech et al. 2015) kodieren, in die bestehenden *S. cerevisiae*-Transformanten eingeführt werden. Erste Arbeitsschritte für eine mögliche Ko-Expression wurden in einem anderen Abschnitt dieser Arbeit bereits durchgeführt.

5.1.2.1. Untersuchungen zu NRPS-ähnlichen Enzymen *in vitro*

Nachdem *in vivo* die Produkte der NRPS-ähnlichen Enzyme in *S. cerevisiae* bestätigt worden waren, sollten die Proteine auch *in vitro* charakterisiert werden. Dafür wurde den Proteinen zunächst ein C-terminaler FLAG-Tag angehängt. 48 Std. nach der Induktion mit Galaktose wurden die transformierten Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Proteine isoliert. Leider konnten die NRPS-ähnlichen Enzyme in der SDS-Page nicht nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Analyse der Proteinexpression anhand einer WesternBlot Detektion wurde festgestellt, dass obwohl die Produktbildung erst nach etwa 40 Std. stagnierte, die Proteinkonzentration der NRPS-ähnlichen Enzyme nach ungefähr 16 Std. am Höchsten war (Abbildung 4-31). Zwar wird bei einer längeren Kultivierung die Zellmasse größer aber die Zellwände der Hefen werden während der limitierten Wachstumsphase dicker und erschweren den Aufschluss der Mikroorganismen (Schweisthal et al. 2016). Daher wurden die Transformanten für die spätere Proteinisolierungen 16 Std. lang kultiviert.

Bei der Kultivierung der Transformanten wurde jedoch beobachtet, dass die Kulturen, die Aspulvinon E produzieren sollten und sich aufgrund dessen gelb färbten, keine gelbe Färbung annahmen. Eine Kontrolle der Produktformation zeigte tatsächlich, dass kein Produkt gebildet worden war (Abbildung 4-32). Auch die Verwendung des nur sechs Aminosäure langen HIS-Tags resultierte in einer stark gehemmten Produktion der gesuchten Metabolite (Abbildung 4-32). Eine stark gehemmte Produktbildung wurde auch bei der Verwendung der Konstrukte pEH8 (AtrA_{At}) und pEH11 (AstA) festgestellt, die durch die Klonierung zwei bzw. drei zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus besaßen (nicht gezeigt). Ein Vergleich des C-Terminus der NRPS-ähnlichen Enzyme zeigt, dass nach Ende der TE-Domäne fast immer drei AS folgen. Da die TE-Domäne sowohl ein Substratmolekül aufnimmt als auch die Dimerisierung der beiden Moleküle katalysiert, ist Aktivität der Proteine anscheinend sehr anfällig für Modifikationen des C-Terminus. Infolgedessen wurde ein HIS₆-Tag an den N-Terminus angefügt. Mit den somit produzierten rekombinierten Enzymen konnten vergleichbare Mengen an Produkt gewonnen werden, wie durch die Proteine ohne

Affinitäts-Tag. Die Proteine wurden erfolgreich aufgereinigt (Abbildung 4-34), aber auch mit unterschiedlichen Bedingungen wurden *in vitro* die erwarteten Produkte nicht gebildet. Auch bei dem Einsatz von Proteinrohextrakt in den Enzymassays konnten die Produkte der NRPS-ähnlichen nicht detektiert werden. Da die ausgewählten Bedingungen schon in anderen Studien erfolgreich für Aktivitätstests von NRPS-ähnlichen Enzymen eingesetzt worden waren, liegt das Scheitern des Experiments wahrscheinlich an inaktiven Proteinen (Geib et al. 2016; Schneider et al. 2008; Wackler et al. 2012). Bei der gewählten Aufschlussmethode werden die Hefezellen mit Glaskugeln zerstört und durch das Mischen auf dem Vortexgerät werden die Hefen kurzzeitig erwärmt, was einen Proteinabbau begünstigt. Außerdem wirken starke Scherkräfte durch die Glaskugeln. Daher sollten für zukünftige Versuche eine andere Methode zum Aufschluss der Zellen verwendet werden. Alternativ sollte auch eine Aufreinigung aus *E. coli* in Betracht gezogen werden. Die im Vergleich zu NRPS relativ kleinen NRPS-ähnlichen Proteine sollten sich leicht in *E. coli* exprimieren lassen. Bei einer erfolgreichen Expression und Produktformation wäre dies unserem Wissen nach auch der ersten Beispiele für eine Expression von NRPS-ähnlichen mit einer A-T-TE-Struktur in *E. coli*. Als Grundlage für diese Experimente wurden daher die NRPS-ähnlichen Gene in den pET28a(+) und in den pEQ60 Vektor kloniert (Tabelle 3-8). Außerdem wurde das NpgA Gen in den pET28a(+) Vektor kloniert. Aufgrund von Zeitmangel konnte die Expression bzw. die Proteinisolierung in *E. coli* leider nicht mehr durchgeführt werden.

5.1.3. Zielgerichteter Austausch der Domänen von NRPS-ähnlichen Enzymen zur Erweiterung der Produktpalette

Ein weiterer Aufgabenbereich bei der Arbeit mit den NRPS-ähnlichen Enzymen sollten die Enzyme an sich modifiziert werden. Wie bereits erwähnt können NRPS auf vielfältige Weise manipuliert werden, um ein gewünschtes Produkt herzustellen. Dabei ist aufgrund mangelnder Daten zu den A-Domänen von NRPS-ähnlichen Enzymen eine gezielte Manipulation der A-Domäne sehr schwierig und der Austausch von ganzen Modulen unmöglich, da die NRPS-ähnlichen nur aus einem Modul bestehen. Somit wurde beschlossen, die Domänen der verfügbaren NRPS-ähnlichen miteinander zu rekombinieren, um andere Produkte zu synthetisieren. Als Basis sollte weiterhin das Expressionssystem in *S. cerevisiae* zusammen mit dem pESC-URA Vektor dienen. Die designten Produkte sollten aus den Kulturen aufgereinigt und die Struktur aufgeklärt werden. Dafür wurden die gewünschten Domänen mit homologen Sequenzüberhängen amplifiziert und mit Hilfe der Homologen Rekombination in *E. coli* in dem Vektor pESC-URA fusioniert. Die A- bzw. A-T-Domänen von ApvA, PgnA, AtqA wurden ausgewählt um die drei verschiedenen Substrate 4-Hydroxyphenylpyruvat, Phenylpyruvat und Indol-3-Pyruvat zu aktivieren. Außerdem wurde die A- bzw. A-T-Domäne von AstA getestet, da sie von aus einem anderen Organismus stammt. Die Gene wurden anschließend mit den T- oder T-TE-Domänen von ApvA, BtyA, PgnA, AtrA_{At} oder AstA komplementiert, die für die Bildung der Kernstruktur verantwortlich sind.

Die Substrate Phenylpyruvat und 4-Hydroxyphenylpyruvat unterscheiden sich lediglich in einer Hydroxyl-Gruppe, daher war bei einem Austausch der beiden Substrate eine erfolgreiche Produktbildung erwartet worden, was auch schon in einigen wenigen Beispielen bestätigt worden war (van Dijk et al. 2016; van Dijk and Wang 2018). Wie erwartet wurden für die Konstrukte, bei denen die A- bzw. A-T-Domänen ApvA und die T- oder T-TE-Domänen von AtrA_{At}, AstA, PgnA und BtyA eingesetzt wurden, in allen getesteten Kombinationen das gesuchte Produkt detektiert werden. Dabei war die Konzentration von Atromentin mit 0,5 – 0,8 mg/l bzw. Butyrolacton IIa mit 30,5 mg/l (pEH118) oder 25,3 mg/l (pEH119) vergleichbar mit der Produktausbeute der natürlichen NRPS-ähnlichen Enzyme. Erstaunlich ist, dass die beiden Konstrukte mit der TE-Domäne von AstA (pEH48 und pEH59) ähnlich Erträge haben, wie die Konstrukte mit der TE-Domäne von AtrA_{At}, obwohl AstA ursprünglich Indolpyruvat aktiviert. Die Kombination der A-Domäne von ApvA und der TE-Domäne PgnA (pEH50 und pEH60) lieferte auch die erwartete Phenylguignarsäure, welches in den pEH60 enthaltenen Hefen mit 8,6 mg/l das dominante Sekundärmetabolit bildet. Die

Konstrukte, die die A-Domäne von PgnA enthalten, hatten im Vergleich mit den natürlichen Produkten mit der gleichen Kernstruktur eine deutlich geringere Ausbeute von höchstens 0,1 mg/l.

Ermutigend ist, dass bei der Verwendung von den A/A-T-Domänen von AtqA und AstA in einigen Konstrukten die erwarteten Sekundärmetabolite nachgewiesen werden konnten. Da die TE-Domänen von ApvA, BtyA, PgnA und AtrA_{At} deutlich kleine Substanzen verwenden, ist das aktive Zentrum wahrscheinlich kleiner und kann so das größere Indolpyruvat nicht aufnehmen.

Die Untersuchung der Produktivität der erhaltenen Transformanten ergab, dass die TE-Domäne von BtyA eine breite Substratflexibilität zeigte und gut mit A/A-T-Domänen anderer Enzyme rekombiniert wurde. Die Konstrukte mit der TE-Domäne von BtyA führten zu den höchsten Produktausbeuten unter denen mit derselben A-Domäne, d.h. 25,3 mg/l für pEH119 und 30,5 mg/l für pEH118, 0,1 mg/l für pEH62 und 0,6 mg/l für pEH120 und 0,5 mg/l für pEH71 und pEH66. Interessanterweise waren die Produktausbeuten einiger Konstrukte, die die A-T-Domänen eines Enzyms und die TE-Domäne eines anderen Enzyms enthalten, höher als die der zugehörigen Konstrukte mit der A-Domäne und der T-TE-Domäne, z. B. 8,6 mg / l für pEH50 gegenüber 0,7 mg / l für pEH60 und 0,6 mg / l für pEH120 gegenüber 0,1 mg / l für pEH62. Bei AstA und PgnA war die Kombination aus A und T-TE (pEH68) jedoch produktiver als die Kombination aus A-T und TE (pEH73).

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Austausch einzelner Domänen zwischen den NRPS-ähnlichen Enzymen möglich ist. Insgesamt wurden 34 rekombinierte Konstrukte hergestellt und für 21 Konstrukte wurde das theoretisch vorhergesagte Produkt nachgewiesen. Für alle verwendeten A-Domänen konnte für mindestens eine Rekombination das erwartete Produkt nachgewiesen werden. Besonders beeindruckend ist, dass auch die Indolpyruvat aktivierenden Enzyme in 5 der Konstrukte erfolgreich das Produkt detektiert wurde. Die Hefe eignet sich daher auch als Expressionsplattform für die Modifikation der NRPS-ähnlichen Enzyme. Weiterführend wäre es interessant, z.B. durch ein molekulares Modeling die T-TE-Strukturen zu untersuchen und anschließend zu modifizieren, sodass auch bei den unnatürlichen Substanzen die Produktausbeute gesteigert werden könnte. Alle bekannten Beispiele von NRPS-ähnlichen mit einer A-T-TE-Architektur aktivieren α -Ketosäuren. Eine Modifikation der A-Domänen wäre somit auch von Interesse.

5.2. Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus *Aspergillus terreus* und *Chaetomium globosum*

In Genom von *A. terreus* finden sich die putativen Prenyltransferase Gene ATEG_00702, ATEG_02823 und ATEG_03092 in den Clustern der in dieser Arbeit untersuchten NRPS-ähnlichen Enzyme (Tabelle 4-11). Auch in *C. globosum* liegt mit ATEG_03684 ein Prenyltransferasegen in der näheren genetischen Umgebung von *astA*. Des Weiteren ist bekannt, dass die NRPS-ähnlichen Produkte Aspulvinon E und Butyrolacton IIa durch die Prenyltransferase AbpB (ATEG_01730) modifiziert werden können (Guo et al. 2015). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits mit diesen fünf für Prenyltransferase kodierenden Gen gearbeitet, aus unterschiedlichen Gründen konnten sie bis zu diesem Zeitpunkt aber nicht biochemisch charakterisiert werden (Rigbers 2014; Tarcz 2014; Wunsch 2014).

Wurde aus dem Stamm *A. terreus* A1156 bzw. *C. globosum* DSM 1962 amplifiziert und in die MCS2 des pESC-HIS eingebracht. ApbB wurde außerdem in die MCS2 des pEH10 Vektors eingefügt, wodurch eine Co-Expression beider Gene mit einem Plasmid möglich wurde. Für die Indolpyruvat aktivierenden NRPS-ähnlichen Enzyme konnte auch deren Produkt DDAQ D nicht nachgewiesen werden. Da die Co-Expression auf Grund von begrenzter Zeit aber nur ein einziges Mal durchgeführt wurde, kann dies an Problemen bei der Co-Transformation gelegen haben. Bei den Transformaten konnten die durch die NRPS-ähnlichen Enzyme hergestellten Substanzen detektiert werden, leider aber nicht die prenylierten Strukturen. In dem pEH23 Konstrukt sind beide Gene auf einem Plasmid kodiert, wodurch ausgeschlossen wird, dass bei unvollständigen Co-Transformation nur eines der Plasmide in die Hefe inseriert wurde. Trotzdem ist auch in dem pEH23 Konstrukt nur das unprenylierte Aspulvinon E nachgewiesen worden. In der näheren genetischen Umgebung der NRPS-ähnlichen befinden sich noch andere modifizierende Enzyme. Eventuell erkennen die Prenyltransferasen nur die modifizierten Substanzen. Da Aspulvinon H und Aspulvinon I dem einfach bzw. zweifach prenyliertem Aspulvinon E entsprechen ist auch ist eine fehlgeschlagene Prenylierung wegen fehlender vorhergehender Modifikationen unwahrscheinlich. Die Prenylierung konnte wahrscheinlich aufgrund von zeitlichen Unterschieden nicht erfolgen. Die Konzentration der NRPS-ähnlichen Enzyme in den Hefen nimmt schon nach 16 Std. deutlich ab. Wird von einer ähnlichen Expression der Prenyltransferasen ausgegangen, nimmt auch ihre Konzentration ab, während ihr Substrat noch nicht oder nur in minimalen Konzentrationen produziert wurde. Daher sollten für

fortlaufende Versuche die NRPS-ähnlichen Enzyme unter die Kontrolle eines konstitutiven Promotors gestellt werden.

Die hier eingesetzten pESC Vektoren erlauben theoretisch nicht nur die Kodierung von zwei Genen auf einem Vektor sondern eine co-Transformation von bsp. dem pESC-URA und dem pESC-HIS. Unter Einsatz dieser Expressionssysteme können somit unterschiedliche Gene unter Einbezug regulatorischer Elemente zur Analyse ihrer Funktion heterolog exprimiert bzw. coexprimiert werden und ihre Funktion direkt in einem geeigneten Wirtsorganismus analysiert werden. Außerdem könnten in zukünftigen Untersuchungen durch die gezielte Kombination unterschiedlicher Enzymkategorien auch die strukturelle Diversität und damit einhergehend die biologische Aktivität neu gewonnener Naturstoffe erhöht werden.

6. Referenzen

- Abdel-Azeem AM (2020) Recent developments on genus *Chaetomium*. Springer International Publishing,
- Ahuja M, Chiang YM, Chang SL, Praseuth MB, Entwistle R, Sanchez JF, Lo HC, Yeh HH, Oakley BR, Wang CC (2012) Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* 134:8212-8221
- Al-Mestarihi AH, Villamizar G, Fernandez J, Zolova OE, Lombo F, Garneau-Tsodikova S (2014) Adenylation and S-methylation of cysteine by the bifunctional enzyme TioN in thiocoraline biosynthesis. *J Am Chem Soc* 136:17350-17354
- Amato A, Becci A, Beolchini F (2020) Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Crit Rev Biotechnol* 40:199-212
- Ammerer G, Hunter CP, Rothman JH, Saari GC, Valls LA, Stevens TH (1986) PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol Cell Biol* 6:2490-2499
- Arabatzis M, Velegraki A (2013) Sexual reproduction in the opportunistic human pathogen *Aspergillus terreus*. *Mycologia* 105:71-79
- Arai K, Masuda K, Kiriya N, Nitta K, Yamamoto Y, Shimizu S (1981) Metabolic products of *Aspergillus terreus*. IV. Metabolites of the strain IFO 8835. (2). The isolation and chemical structure of indolyl benzoquinone pigments. *Chem Pharm Bull* 29:961-969
- Ashby MN, Kutsunai SY, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards PA (1992) COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J Biol Chem* 267:4128-4136
- Awakawa T, Mori T, Nakashima Y, Zhai R, Wong CP, Hillwig ML, Liu X, Abe I (2018) Molecular insight into the Mg²⁺-dependent allosteric control of indole prenylation by aromatic prenyltransferase AmbP1. *Angew Chem Int Ed Engl* 57:6810-6813
- Awakawa T, Zhang L, Wakimoto T, Hoshino S, Mori T, Ito T, Ishikawa J, Tanner ME, Abe I (2014) A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J Am Chem Soc* 136:9910-9913
- Backhaus K, Ludwig-Radtke L, Xie X, Li S-M (2017) Manipulation of the precursor supply in yeast significantly enhances the accumulation of prenylated beta-carbolines. *ACS Synth Biol* 6:1056-1064
- Balajee SA (2009) *Aspergillus terreus* complex. *Med Mycol* 47 Suppl 1:S42-S46
- Balibar CJ, Howard-Jones AR, Walsh CT (2007) Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat Chem Biol* 3:584-592
- Balibar CJ, Vaillancourt FH, Walsh CT (2005) Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol* 12:1189-1200

- Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD (2014) The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat Prod Rep* 31:61-108
- Belshaw PJ, Walsh CT, Stachelhaus T (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* 284:486-489
- Bennett RJ, Turgeon BG (2016) Fungal Sex: The Ascomycota. *Microbiol Spectr* 4
- Bergendahl V, Linne U, Marahiel MA (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* 269:620-629
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* 47:W81-W87
- Bloudoff K, Alonzo DA, Schmeing TM (2016) Chemical probes allow structural insight into the condensation reaction of nonribosomal peptide synthetases. *Cell Chem Biol* 23:331-339
- Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, Murillo R, Glasner JD, Keller NP (2006) Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol* 13:31-37
- Bond C, Tang Y, Li L (2016) *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for mining, studying and engineering fungal polyketide synthases. *Fungal Genet Biol* 89:52-61
- Bozhüyük KAJ, Fleischhacker F, Linck A, Wesche F, Tietze A, Niesert CP, Bode HB (2018) De novo design and engineering of non-ribosomal peptide synthetases. *Nat Chem* 10:275-281
- Braesel J, Gotze S, Shah F, Heine D, Tauber J, Hertweck C, Tunlid A, Stallforth P, Hoffmeister D (2015) Three redundant synthetases secure redox-active pigment production in the basidiomycete *Paxillus involutus*. *Chem Biol* 22:1325-1334
- Bruner SD, Weber T, Kohli RM, Schwarzer D, Marahiel MA, Walsh CT, Stubbs MT (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* 10:301-310
- Butler N, Kunjapur AM (2020) Carboxylic acid reductases in metabolic engineering. *J Biotechnol* 307:1-14
- Calcott MJ, Owen JG, Lamont IL, Ackerley DF (2014) Biosynthesis of novel Pyoverdines by domain substitution in a nonribosomal peptide synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 80:5723-5731
- Calvo AM (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* 45:1053-1061
- Calvo AM, Bok J, Brooks W, Keller NP (2004) veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 70:4733-4739
- Challis GL, Ravel J (2000) Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol Lett* 187:111-114

- Challis GL, Ravel J, Townsend CA (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* 7:211-224
- Chen R, Gao B, Liu X, Ruan F, Zhang Y, Lou J, Feng K, Wunsch C, Li S-M, Dai J, Sun F (2017) Molecular insights into the enzyme promiscuity of an aromatic prenyltransferase. *Nat Chem Biol* 13:226-234
- Chen WH, Li K, Guntaka NS, Bruner SD (2016) Interdomain and intermodule organization in epimerization domain containing nonribosomal peptide synthetases. *ACS Chem Biol* 11:2293-2303
- Chhabra A, Haque AS, Pal RK, Goyal A, Rai R, Joshi S, Panjikar S, Pasha S, Sankaranarayanan R, Gokhale RS (2012) Nonprocessive [2 + 2] π -off-loading reductase domains from mycobacterial nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5681-5686
- Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Keller N, Oakley BR, Wang CC (2009) A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* 131:2965-2970
- Chooi YH, Wang P, Fang J, Li Y, Wu K, Wang P, Tang Y (2012) Discovery and characterization of a group of fungal polycyclic polyketide prenyltransferases. *J Am Chem Soc* 134:9428-9437
- Clevenger KD, Bok JW, Ye R, Miley GP, Verdan MH, Velk T, Chen C, Yang K, Robey MT, Gao P, Lamprecht M, Thomas PM, Islam MN, Palmer JM, Wu CC, Keller NP, Kelleher NL (2017) A scalable platform to identify fungal secondary metabolites and their gene clusters. *Nat Chem Biol* 13:895-901
- Cohen PA, Robinson PD (2001) 2,5-Diphenyl-3,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone (polyporic acid). *Acta Crystallographica Section E* 57:596-598
- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* 16:4174-4183
- Cosmina P, Rodriguez F, de FF, Grandi G, Perego M, Venema G, van SD (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 8:821-831
- da Silva IP, Brissow E, Kellner Filho LC, Senabio J, de Siqueira KA, Vandresen FS, Damasceno JL, Mendes SA, Tavares DC, Magalhaes LG, Junior PA, Januario AH, Soares MA (2017) Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*-F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World J Microbiol Biotechnol* 33:62
- Dai Z, Liu Y, Guo J, Huang L, Zhang X (2015) Yeast synthetic biology for high-value metabolites. *FEMS Yeast Res* 15:1-11
- Derrington SR, Turner NJ, France SP (2019) Carboxylic acid reductases (CARs): An industrial perspective. *J Biotechnol* 304:78-88
- Dewangan J, Srivastava S, Mishra S, Pandey PK, Divakar A, Rath SK (2018) Chetomin induces apoptosis in human triple-negative breast cancer cells by promoting calcium overload and mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 495:1915-1921

- Dewi RT, Tachibana S, Fajriah S, Hanafi M (2015) α -Glucosidase inhibitor compounds from *Aspergillus terreus* RCC1 and their antioxidant activity. *Med Chem Res* 24:737-743
- Drake EJ, Miller BR, Shi C, Tarrasch JT, Sundlov JA, Allen CL, Skiniotis G, Aldrich CC, Gulick AM (2016) Structures of two distinct conformations of holo-non-ribosomal peptide synthetases. *Nature* 529:235-238
- Drake EJ, Nicolai DA, Gulick AM (2006) Structure of the EntB multidomain nonribosomal peptide synthetase and functional analysis of its interaction with the EntE adenylation domain. *Chem Biol* 13:409-419
- Du L, Lou L (2010) PKS and NRPS release mechanisms. *Nat Prod Rep* 27:255-278
- Edwards DJ, Gerwick WH (2004) Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J Am Chem Soc* 126:11432-11433
- Eisenman HC, Casadevall A (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:931-940
- Elshahawi SI, Cao H, Shaaban KA, Ponomareva LV, Subramanian T, Farman ML, Spielmann HP, Phillips GN, Jr., Thorson JS, Singh S (2017) Structure and specificity of a permissive bacterial C-prenyltransferase. *Nat Chem Biol* 13:366-368
- Esquilin-Lebron KJ, Boynton TO, Shimkets LJ, Thomas MG (2018) An Orphan MbtH-Like Protein Interacts with Multiple Nonribosomal Peptide Synthetases in *Myxococcus xanthus* DK1622. *J Bacteriol* 200
- Fan A, Chen H, Wu R, Xu H, Li S-M (2014) A new member of the DMATS superfamily from *Aspergillus niger* catalyzes prenylations of both tyrosine and tryptophan derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:10119-10129
- Fan A, Winkelblech J, Li S-M (2015a) Impacts and perspectives of prenyltransferases of the DMATS superfamily for use in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7399-7415
- Fan A, Zocher G, Stec E, Stehle T, Li S-M (2015b) Site-directed mutagenesis switching a dimethylallyl tryptophan synthase to a specific tyrosine C₃-prenylating enzyme. *J Biol Chem* 290:1364-1373
- Felnagle EA, Barkei JJ, Park H, Podevels AM, McMahon MD, Drott DW, Thomas MG (2010) MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* 49:8815-8817
- Fletcher E, Krivoruchko A, Nielsen J (2016) Industrial systems biology and its impact on synthetic biology of yeast cell factories. *Biotechnol Bioeng* 113:1164-1170
- Fogle MR, Douglas DR, Jumper CA, Straus DC (2008) Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum* is favored in a neutral pH. *Int J Mol Sci* 9:2357-2365
- Forseth RR, Amaike S, Schwenk D, Affeldt KJ, Hoffmeister D, Schroeder FC, Keller NP (2013) Homologous NRPS-like gene clusters mediate redundant small-molecule biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:1590-1594

- Forsgren M, Attersand A, Lake S, Grunler J, Swiezewska E, Dallner G, Climent I (2004) Isolation and functional expression of human *COQ2*, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem J* 382:519-526
- Friedrich C (2006) [Between chance and deliberate development: the history of beta-lactam antibiotics]. *Pharm Unserer Zeit* 35:392-398
- Frueh DP, Arthanari H, Koglin A, Vosburg DA, Bennett AE, Walsh CT, Wagner G (2008) Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature* 454:903-906
- Gahlloth D, Dunstan MS, Quaglia D, Klumbys E, Lockhart-Cairns MP, Hill AM, Derrington SR, Scrutton NS, Turner NJ, Leys D (2017) Structures of carboxylic acid reductase reveal domain dynamics underlying catalysis. *Nat Chem Biol* 13:975-981
- Gao H, Guo W, Wang Q, Zhang L, Zhu M, Zhu T, Gu Q, Wang W, Li D (2013a) Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. *Bioorg Med Chem Lett* 23:1776-1778
- Gao H, Zhu T, Li D, Gu Q, Liu W (2013b) Prenylated indole diketopiperazine alkaloids from a mangrove rhizosphere soil derived fungus *Aspergillus effuses* H1-1. *Arch Pharm Res* 36:952-956
- Gao X, Haynes SW, Ames BD, Wang P, Vien LP, Walsh CT, Tang Y (2012) Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat Chem Biol* 8:823-830
- Gaudelli NM, Long DH, Townsend CA (2015) Beta-Lactam formation by a non-ribosomal peptide synthetase during antibiotic biosynthesis. *Nature* 520:383-387
- Gaudelli NM, Townsend CA (2014) Epimerization and substrate gating by a TE domain in beta-lactam antibiotic biosynthesis. *Nat Chem Biol* 10:251-258
- Gehring AM, Mori I, Walsh CT (1998) Reconstitution and characterization of the Escherichia coli enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* 37:2648-2659
- Geib E, Gressler M, Viedernikova I, Hillmann F, Jacobsen ID, Nietzsche S, Hertweck C, Brock M (2016) A non-canonical melanin biosynthesis pathway protects *Aspergillus terreus* conidia from environmental stress. *Cell Chem Biol* 23:587-597
- Genchi G (2017) An overview on D-amino acids. *Amino Acids* 49:1521-1533
- Gond SK, Mishra A, harma VK, Verma SK, Kumar J, Kharwar RN, Kumar A (2012) Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience* 53:113-121
- Gonsior M, Muhlenweg A, Tietzmann M, Rausch S, Poch A, Sussmuth RD (2015) Biosynthesis of the peptide antibiotic feglymycin by a linear nonribosomal peptide synthetase mechanism. *Chembiochem* 16:2610-2614
- Gulick AM (2009) Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol* 4:811-827

- Guo CJ, Knox BP, Sanchez JF, Chiang YM, Bruno KS, Wang CCC (2013a) Application of an efficient gene targeting system linking secondary metabolites to their biosynthetic genes in *Aspergillus terreus*. *Org Lett*:3562-3565
- Guo CJ, Yeh HH, Chiang YM, Sanchez JF, Chang SL, Bruno KS, Wang CCC (2013b) Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *J Am Chem Soc* 135:7205-7213
- Guo C-J, Sun W-W, Bruno KS, Oakley BR, Keller NP, Wang CCC (2015) Spatial regulation of a common precursor from two distinct genes generates metabolite diversity. *Chem Sci* 6:5913-5921
- Guo C-J, Wang CCC (2014) Recent advances in genome mining of secondary metabolites in *Aspergillus terreus*. *Front Microbiol* 5:717
- Hai Y, Jenner M, Tang Y (2019) Complete stereoinversion of l-Tryptophan by a fungal single-module nonribosomal peptide synthetase. *J Am Chem Soc* 141:16222-16226
- Haque AS, Patel KD, Deshmukh MV, Chhabra A, Gokhale RS, Sankaranarayanan R (2014) Delineating the reaction mechanism of reductase domains of nonribosomal peptide synthetases from mycobacteria. *J Struct Biol* 187:207-214
- Harden BJ, Frueh DP (2017) Molecular cross-talk between nonribosomal peptide synthetase carrier proteins and unstructured linker regions. *Chembiochem* 18:629-632
- Haslinger K, Redfield C, Cryle MJ (2015) Structure of the terminal PCP domain of the non-ribosomal peptide synthetase in teicoplanin biosynthesis. *Proteins* 83:711-721
- Hawksworth DL, Lucking R (2017) Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* 5:vv
- Haynes SW, Gao X, Tang Y, Walsh CT (2013) Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: A two-enzyme pathway to the hexacyclic MDR export pump inhibitor ardeemin. *ACS Chem Biol* 8:741-748
- Herbst DA, Boll B, Zocher G, Stehle T, Heide L (2013) Structural basis of the interaction of MbtH-like proteins, putative regulators of nonribosomal peptide biosynthesis, with adenylating enzymes. *J Biol Chem* 288:1991-2003
- Hoffmann K, Schneider-Scherzer E, Kleinkauf H, Zocher R (1994) Purification and characterization of eucaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis. *J Biol Chem* 269:12710-12714
- Holmquist M (2000) Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* 1:209-235
- Horsman ME, Hari TP, Boddy CN (2016) Polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase thioesterase selectivity: logic gate or a victim of fate? *Nat Prod Rep* 33:183-202
- Horvat M, Fritsche S, Kourist R, Winkler M (2019) Characterization of type IV carboxylate reductases (CARs) for whole cell-mediated preparation of 3-hydroxytyrosol. *ChemCatChem* 11:4171-4181

- Houbraken J, Kocsube S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC (2020) Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol* 95:5-169
- Hoyer KM, Mahlert C, Marahiel MA (2007) The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chem Biol* 14:13-22
- Huang T, Duan Y, Zou Y, Deng Z, Lin S (2018) NRPS protein MarQ catalyzes flexible adenylation and specific S-methylation. *ACS Chem Biol* 13:2387-2391
- Hubbard BK, Walsh CT (2003) Vancomycin assembly: nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* 42:730-765
- Hühner E, Öqvist K, Li S-M (2019) Design of α -keto carboxylic acid dimers by domain recombination of nonribosomal peptide synthetase (NRPS)-like enzymes. *Org Lett* 21:498-502
- Izore T, Cryle MJ (2018) The many faces and important roles of protein-protein interactions during non-ribosomal peptide synthesis. *Nat Prod Rep* 35:1120-1139
- Izore T, Tailhades J, Hansen MH, Kaczmariski JA, Jackson CJ, Cryle MJ (2019) *Drosophila melanogaster* nonribosomal peptide synthetase Ebony encodes an atypical condensation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:2913-2918
- Jaremko MJ, Lee DJ, Opella SJ, Burkart MD (2015) Structure and substrate sequestration in the pyoluteorin type II peptidyl carrier protein PltL. *J Am Chem Soc* 137:11546-11549
- Jaremko MJ, Lee DJ, Patel A, Winslow V, Opella SJ, McCammon JA, Burkart MD (2017) Manipulating protein-protein interactions in nonribosomal peptide synthetase type II peptidyl carrier proteins. *Biochemistry* 56:5269-5273
- Jost M, Zocher G, Tarcz S, Matuschek M, Xie X, Li S-M, Stehle T (2010) Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J Am Chem Soc* 132:17849-17858
- Kaljunen H, Schiefelbein SH, Stummer D, Kozak S, Meijers R, Christiansen G, Rentmeister A (2015) Structural elucidation of the bispecificity of A domains as a basis for activating non-natural amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 54:8833-8836
- Kavanagh KL, Jornvall H, Persson B, Oppermann U (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65:3895-3906
- Keating TA, Marshall CG, Walsh CT (2000) Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry* 39:15522-15530
- Keating TA, Marshall CG, Walsh CT, Keating AE (2002) The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* 9:522-526

- Keller NP (2019) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol* 17:167-180
- Kerstens W, Van DP (2018) A Cinderella story: how the vacuolar proteases Pep4 and Prb1 do more than cleaning up the cell's mass degradation processes. *Microb Cell* 5:438-443
- Khalidi N, Seifuddin FT, Turner G, Haft D, Nierman WC, Wolfe KH, Fedorova ND (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet Biol* 47:736-741
- Kim JM, Song HY, Choi HJ, So KK, Kim DH, Chae KS, Han DM, Jahng KY (2015) Characterization of NpgA, a 4'-phosphopantetheinyl transferase of *Aspergillus nidulans*, and evidence of its involvement in fungal growth and formation of conidia and cleistothecia for development. *J Microbiol* 53:21-31
- Kim WE, Patel A, Hur GH, Tufar P, Wuo MG, McCammon JA, Burkart MD (2019) Mechanistic probes for the epimerization domain of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* 20:147-152
- Kinatukara P, Patel KD, Haque AS, Singh R, Gokhale RS, Sankaranarayanan R (2016) Structural insights into the regulation of NADPH binding to reductase domains of nonribosomal peptide synthetases: A concerted loop movement model. *J Struct Biol* 194:368-374
- Koglin A, Lohr F, Bernhard F, Rogov VV, Frueh DP, Strieter ER, Mofid MR, Guntert P, Wagner G, Walsh CT, Marahiel MA, Dotsch V (2008) Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature* 454:907-911
- Koglin A, Mofid MR, Lohr F, Schafer B, Rogov VV, Blum MM, Mittag T, Marahiel MA, Bernhard F, Dotsch V (2006) Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science* 312:273-276
- Kotowska M, Pawlik K (2014) Roles of type II thioesterases and their application for secondary metabolite yield improvement. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7735-7746
- Kraas FI, Giessen TW, Marahiel MA (2012) Exploring the mechanism of lipid transfer during biosynthesis of the acidic lipopeptide antibiotic CDA. *FEBS Lett* 586:283-288
- Kraas FI, Helmetag V, Wittmann M, Strieker M, Marahiel MA (2010) Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* 17:872-880
- Kremer A, Li S-M (2010) A tyrosine *O*-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* 156:278-286
- Kries H (2016) Biosynthetic engineering of nonribosomal peptide synthetases. *J Pept Sci* 22:564-570
- Kück U, Nowrousion M, Hoff B, and Engh I (2009) Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden und Bekämpfung. Springer Berlin (Verlag),

- Kudo F, Miyanaga A, Eguchi T (2019) Structural basis of the nonribosomal codes for nonproteinogenic amino acid selective adenylation enzymes in the biosynthesis of natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:515-536
- La Clair JJ, Foley TL, Schegg TR, Regan CM, Burkart MD (2004) Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis. *Chem Biol* 11:195-201
- Labby KJ, Watsula SG, Garneau-Tsodikova S (2015) Interrupted adenylation domains: unique bifunctional enzymes involved in nonribosomal peptide biosynthesis. *Nat Prod Rep* 32:641-653
- Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahiel MA, Reid R, Khosla C, Walsh CT (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* 3:923-936
- Lass-Florl C (2018) Treatment of infections due to *Aspergillus terreus* species complex. *J Fungi (Basel)* 4:83
- Lee KKM, Da Silva NA, Kealey JT (2009) Determination of the extent of phosphopantetheinylation of polyketide synthases expressed in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem* 394:75-80
- Lee KS, Lee BM, Ryu JH, Kim DH, Kim YH, Lim SK (2016) Increased vancomycin production by overexpression of MbtH-like protein in *Amycolatopsis orientalis* KfCC10990P. *Lett Appl Microbiol* 63:222-228
- Lee TV, Johnson LJ, Johnson RD, Koulman A, Lane GA, Lott JS, Arcus VL (2010) Structure of a eukaryotic nonribosomal peptide synthetase adenylation domain that activates a large hydroxamate amino acid in siderophore biosynthesis. *J Biol Chem* 285:2415-2427
- Leonardi R, Zhang YM, Rock CO, Jackowski S (2005) Coenzyme A: back in action. *Prog Lipid Res* 44:125-153
- Li C, Matsuda Y, Gao H, Hu D, Yao XS, Abe I (2016) Biosynthesis of LL-Z1272B: Discovery of a new member of NRPS-like enzymes for aryl-aldehyde formation. *Chembiochem* 17:904-907
- Li L, Deng W, Song J, Ding W, Zhao QF, Peng C, Song WW, Tang GL, Liu W (2008a) Characterization of the saframycin A gene cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 revealing a nonribosomal peptide synthetase system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner. *J Bacteriol* 190:251-263
- Li S-M (2010) Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat Prod Rep* 27:57-78
- Li W (2016) Bringing bioactive compounds into membranes: The UbiA superfamily of intramembrane aromatic prenyltransferases. *Trends Biochem Sci* 41:356-370
- Li Y, Weissman KJ, Muller R (2008b) Myxochelin biosynthesis: direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester. *J Am Chem Soc* 130:7554-7555

- Lian J, Mishra S, Zhao H (2018) Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metab Eng* 50:85-108
- Liao G, Mai P, Fan J, Zocher G, Stehle T, Li S-M (2018) Complete decoration of the indolyl residue in *cyclo*-L-Trp-L-Trp with geranyl moieties by using engineered dimethylallyl transferases. *Org Lett* 20:7201-7205
- Liebhold M, Xie X, Li S-M (2013) Breaking cyclic dipeptide prenyltransferase regioselectivity by unnatural alkyl donors. *Org Lett* 15:3062-3065
- Lin TS, Chiang YM, Wang CC (2016) Biosynthetic pathway of the reduced polyketide product citreoviridin in *Aspergillus terreus* var. *aureus* revealed by heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Org Lett* 18:1366-1369
- Linne U, Marahiel MA (2000) Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry* 39:10439-10447
- Liu C, Minami A, Dai T, Gomi K, Scott B, Oikawa H (2016) Biosynthesis of shearinine: Diversification of a tandem prenyl moiety of fungal indole diterpenes. *Org Lett* 18:5026-5029
- Liu C, Minami A, Noike M, Toshima H, Oikawa H, Dai T (2013) Regiospecificities and prenylation mode specificities of the fungal indole diterpene prenyltransferases AtmD and PaxD. *Appl Environ Microbiol* 79:7298-7304
- Liu C, Noike M, Minami A, Oikawa H, Dai T (2014) Functional analysis of a prenyltransferase gene (paxD) in the paxilline biosynthetic gene cluster. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:199-206
- Liu Y, Zheng T, Bruner SD (2011) Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 18:1482-1488
- Lundy TA, Mori S, Garneau-Tsodikova S (2019) Probing the limits of interrupted adenylation domains by engineering a trifunctional enzyme capable of adenylation, N-, and S-methylation. *Org Biomol Chem* 17:1169-1175
- Ma J, Zuo D, Song Y, Wang B, Huang H, Yao Y, Li W, Zhang S, Zhang C, Ju J (2012) Characterization of a single gene cluster responsible for methylpendolmycin and pendolmycin biosynthesis in the deep sea bacterium *Marinactinospora thermotolerans*. *Chembiochem* 13:547-552
- Mai P, Coby L, Li S-M (2019) Different behaviors of cyclic dipeptide prenyltransferases toward the tripeptide derivative ardeemin fumiquinazoline and its enantiomer. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:3773-3781
- Mai P, Zocher G, Stehle T, Li S-M (2018) Structure-based protein engineering enables prenyl donor switching of a fungal aromatic prenyltransferase. *Org Biomol Chem* 16:7461-7469
- Manavalan B, Murugapiran SK, Lee G, Choi S (2010) Molecular modeling of the reductase domain to elucidate the reaction mechanism of reduction of peptidyl thioester into its corresponding alcohol in non-ribosomal peptide synthetases. *BMC Struct Biol* 10:1

- Marshall CG, Hillson NJ, Walsh CT (2002) Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry* 41:244-250
- Matsuda K, Kobayashi M, Kuranaga T, Takada K, Ikeda H, Matsunaga S, Wakimoto T (2019) SurE is a trans-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides. *Org Biomol Chem* 17:1058-1061
- Mayorga ME, Timberlake WE (1992) The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Mol Gen Genet* 235:205-212
- McAlister L, Holland MJ (1985) Isolation and characterization of yeast strains carrying mutations in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* 260:15013-15018
- Metzger U, Schall C, Zocher G, Unsöld I, Stec E, Li S-M, Heide L, Stehle T (2009) The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14309-14314
- Meyer S, Kehr JC, Mainz A, Dehm D, Petras D, Sussmuth RD, Dittmann E (2016) Biochemical dissection of the natural diversification of microcystin provides lessons for synthetic biology of NRPS. *Cell Chem Biol* 23:462-471
- Miao V, Coeffet-Le Gal MF, Nguyen K, Brian P, Penn J, Whiting A, Steele J, Kau D, Martin S, Ford R, Gibson T, Bouchard M, Wrigley SK, Baltz RH (2006) Genetic engineering in *Streptomyces roseosporus* to produce hybrid lipopeptide antibiotics. *Chem Biol* 13:269-276
- Miller BR, Drake EJ, Shi C, Aldrich CC, Gulick AM (2016) Structures of a nonribosomal peptide synthetase module bound to MbtH-like proteins support a highly dynamic domain architecture. *J Biol Chem* 291:22559-22571
- Miller JD, McMullin DR (2014) Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9953-9966
- Moore D, Robson GD, and Trinci APJ (2011) 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press,
- Mootz HD, Finking R, Marahiel MA (2001) 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 276:37289-37298
- Mori S, Pang AH, Lundy TA, Garzan A, Tsodikov OV, Garneau-Tsodikova S (2018) Structural basis for backbone N-methylation by an interrupted adenylation domain. *Nat Chem Biol* 14:428-430
- Mori T, Zhang L, Awakawa T, Hoshino S, Okada M, Morita H, Abe I (2016) Manipulation of prenylation reactions by structure-based engineering of bacterial indolactam prenyltransferases. *Nat Commun* 7:10849
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172:1557-1566

- Nguyen KT, Ritz D, Gu JQ, Alexander D, Chu M, Miao V, Brian P, Baltz RH (2006) Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17462-17467
- Nielsen MT, Nielsen JB, Anyaogu DC, Holm DK, Nielsen KF, Larsen TO, Mortensen UH (2013) Heterologous reconstitution of the intact geodin gene cluster in *Aspergillus nidulans* through a simple and versatile PCR based approach. *PLoS One* 8:e72871
- Niquille DL, Hansen DA, Mori T, Fercher D, Kries H, Hilvert D (2018) Nonribosomal biosynthesis of backbone-modified peptides. *Nat Chem* 10:282-287
- Noike M, Liu C, Ono Y, Hamano Y, Toyomasu T, Sassa T, Kato N, Dairi T (2012) An enzyme catalyzing *O*-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem* 13:566-573
- Oberegger H, Eisendle M, Schrettl M, Graessle S, Haas H (2003) 4'-phosphopantetheinyl transferase-encoding *npgA* is essential for siderophore biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 44:211-215
- Ohara K, Muroya A, Fukushima N, Yazaki K (2009) Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of p-hydroxybenzoic acid. *Biochem J* 421:231-241
- Ojima N, Takenaka S, Seto S (1975) Structures of pulvinone derivatives from *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry* 14:573-576
- Ojima N, Takenaka S, Seto S (1973) New butenolides from *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry* 12:2527-2529
- Oliver RA, Li R, Townsend CA (2018) Monobactam formation in sulfazecin by a nonribosomal peptide synthetase thioesterase. *Nat Chem Biol* 14:5-7
- Osharov N, May G (2000) Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155:647-656
- Osman KT, Du L, He Y, Luo Y (2009) Crystal structure of *Bacillus cereus* D-alanyl carrier protein ligase (DltA) in complex with ATP. *J Mol Biol* 388:345-355
- Pan Y, Liu L, Guan F, Li E, Jin J, Li J, Che Y, Liu G (2018) Characterization of a prenyltransferase for iso-A82775C biosynthesis and generation of new congeners of chloropestolides. *ACS Chem Biol* 13:703-711
- Park JH, Choi GJ, Jang KS, Lim HK, Kim HT, Cho KY, Kim JC (2005) Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. *FEMS Microbiol Lett* 252:309-313
- Parkinson EI, Tryon JH, Goering AW, Ju KS, McClure RA, Kemball JD, Zhukovsky S, Labeda DP, Thomson RJ, Kelleher NL, Metcalf WW (2018) Discovery of the tyrobetaine natural products and their biosynthetic gene cluster via metabologenomics. *ACS Chem Biol* 13:1029-1037

- Patel HM, Walsh CT (2001) In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry* 40:9023-9031
- Patel KD, d'Andrea FB, Gaudelli NM, Buller AR, Townsend CA, Gulick AM (2019) Structure of a bound peptide phosphonate reveals the mechanism of nocardicin bifunctional thioesterase epimerase-hydrolase half-reactions. *Nat Commun* 10:3868
- Peng C, Tang YM, Li L, Ding W, Deng W, Pu JY, Liu W, Tang GL (2012) In vivo investigation of the role of SfmO2 in saframycin A biosynthesis by structural characterization of the analogue saframycin O. *Science China Chemistry* 55:90-97
- Peschke M, Brieke C, Heimes M, Cryle MJ (2018) The thioesterase domain in glycopeptide antibiotic biosynthesis is selective for cross-linked aglycones. *ACS Chem Biol* 13:110-120
- Pirrung MC, Liu Y, Deng L, Halstead DK, Li Z, May JF, Wedel M, Austin DA, Webster NJG (2005) Methyl Scanning: Total synthesis of demethylasterriquinone B1 and derivatives for identification of sites of interaction with and isolation of its receptor(s). *J Amer Chem Soc* 127:4609-4624
- Pockrandt D, Ludwig L, Fan A, König GM, Li S-M (2012) New insights into the biosynthesis of prenylated xanthenes: XptB from *Aspergillus nidulans* catalyses an *O*-prenylation of xanthenes. *Chembiochem* 13:2764-2771
- Pockrandt D, Sack C, Kosiol T, Li S-M (2014) A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyses *C*-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4987-4994
- Posch W, Blatzer M, Wilflingseder D, Lass-Flörl C (2018) *Aspergillus terreus*: Novel lessons learned on amphotericin B resistance. *Med Mycol* 56:73-82
- Prokhorov VP, Linnik MA (2011) Morphological, cultural, and biodestructive peculiarities of *Chaetomium* Species. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 66:95-101
- Puel O, Galtier P, Oswald IP (2010) Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins (Basel)* 2:613-631
- Quadri LE, Sello J, Keating TA, Weinreb PH, Walsh CT (1998a) Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* 5:631-645
- Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT (1998b) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* 37:1585-1595
- Rahaman ST (2018) Bleomycin: An overview on anti cancer drug. *ijramr* 05:3618-3622
- Raju R, Piggott AM, Huang XC, Capon RJ (2011) Nocardioazines: a novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits p-glycoprotein. *Org Lett* 13:2770-2773

- Rao KV, Sadhukhan AK, Veerender M, Ravikumar V, Mohan EV, Dhanvantri SD, Sitaramkumar M, Babu JM, Vyas K, Reddy GO (2000) Butyrolactones from *Aspergillus terreus*. Chem Pharm Bull 48:559-562
- Rausch C, Hoof I, Weber T, Wohlleben W, Huson DH (2007) Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. BMC Evol Biol 7:78
- Read JA, Walsh CT (2007) The lyngbyatoxin biosynthetic assembly line: chain release by four-electron reduction of a dipeptidyl thioester to the corresponding alcohol. J Am Chem Soc 129:15762-15763
- Reger AS, Wu R, Dunaway-Mariano D, Gulick AM (2008) Structural characterization of a 140 degrees domain movement in the two-step reaction catalyzed by 4-chlorobenzoate:CoA ligase. Biochemistry 47:8016-8025
- Reimer JM, Aloise MN, Harrison PM, Schmeing TM (2016) Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase. Nature 529:239-242
- Ren H, Wang B, Zhao H (2017) Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. Curr Opin Biotechnol 48:21-27
- Richardt A, Kemme T, Wagner S, Schwarzer D, Marahiel MA, Hovemann BT (2003) Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. J Biol Chem 278:41160-41166
- Rigbers O (2014) Untersuchungen zu einer Methyltransferase und verschiedenen Prenyltransferasen aus dem Sekundärstoffwechsel von *Aspergillus*-Arten. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Roche ED, Walsh CT (2003) Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis. Biochemistry 42:1334-1344
- Rudolf JD, Poulter CD (2013) Tyrosine *O*-prenyltransferase SirD catalyzes *S*-, *C*-, and *N*-prenylations on tyrosine and tryptophan derivatives. ACS Chem Biol 8:2707-2714
- Saha BC (2017) Emerging biotechnologies for production of itaconic acid and its applications as a platform chemical. J Ind Microbiol Biotechnol 44:303-315
- Samel SA, Czodrowski P, Essen LO (2014) Structure of the epimerization domain of tyrocidine synthetase A. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 70:1442-1452
- Samel SA, Schoenafinger G, Knappe TA, Marahiel MA, Essen LO (2007) Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. Structure 15:781-792
- Samel SA, Wagner B, Marahiel MA, Essen LO (2006) The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. J Mol Biol 359:876-889
- Schaffer JE, Reck MR, Prasad NK, Wenciewicz TA (2017) β -Lactone formation during product release from a nonribosomal peptide synthetase. Nat Chem Biol 13:737-744

- Schmelz S, Naismith JH (2009) Adenylate-forming enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 19:666-671
- Schneider A, Stachelhaus T, Marahiel MA (1998) Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol Gen Genet* 257:308-318
- Schneider P, Bouhired S, Hoffmeister D (2008) Characterization of the atromentin biosynthesis genes and enzymes in the homobasidiomycete *Tapinella panuoides*. *Fungal Genet Biol* 45:1487-1496
- Schneider P, Weber M, Rosenberger K, Hoffmeister D (2007) A one-pot chemoenzymatic synthesis for the universal precursor of antidiabetes and antiviral bis-indolylquinones. *Chem Biol* 14:635-644
- Schomer RA, Thomas MG (2017) Characterization of the functional variance in MbtH-like protein interactions with a nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry* 56:5380-5390
- Schuller JM, Zocher G, Liebhold M, Xie X, Stahl M, Li S-M, Stehle T (2012) Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity. *J Mol Biol* 422:87-99
- Schwarzer D, Mootz HD, Linne U, Marahiel MA (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14083-14088
- Schweisthal S, Sterk C, Heinisch J (2016) Hilfe für gestresste Hefen: der Zellwand-Integritätsweg. *BIOspektrum* 22:131-133
- Shaw-Reid CA, Kelleher NL, Losey HC, Gehring AM, Berg C, Walsh CT (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol* 6:385-400
- Shi D, Lu G, Mei H, de Hoog GS, Zheng H, Liang G, Shen Y, Li T, Liu W (2016) Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* with yellowish black discoloration and periungual inflammation. *Med Mycol Case Rep* 13:12-16
- Shou Q, Feng L, Long Y, Han J, Nunnery JK, Powell DH, Butcher RA (2016) A hybrid polyketide-nonribosomal peptide in nematodes that promotes larval survival. *Nat Chem Biol* 12:770-772
- Shrestha SK, Garneau-Tsodikova S (2016) Expanding substrate promiscuity by engineering a novel adenylating-methylating NRPS bifunctional enzyme. *Chembiochem* 17:1328-1332
- Skinninger MA, Dejong CA, Rees PN, Johnston CW, Li H, Webster AL, Wyatt MA, Magarvey NA (2015) Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). *Nucleic Acids Res* 43:9645-9662
- Song HY, Choi D, Han DM, Kim DH, Kim JM (2018) A novel rapid fungal promoter analysis system using the phosphopantetheinyl transferase gene, *npaA*, in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 46:429-439

- Stachelhaus T, Huser A, Marahiel MA (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* 3:913-921
- Stachelhaus T, Mootz HD, Bergendahl V, Marahiel MA (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* 273:22773-22781
- Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 6:493-505
- Stachelhaus T, Schneider A, Marahiel MA (1995) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* 269:69-72
- Stachelhaus T, Walsh CT (2000) Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* 39:5775-5787
- Stanišić A, Kries H (2019) Adenylation domains in nonribosomal peptide engineering. *Chembiochem* 20:1347-1356
- Stein T, Kluge B, Vater J, Franke P, Otto A, Wittmann-Liebold B (1995) Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry* 34:4633-4642
- Stein T, Vater J, Kruff V, Otto A, Wittmann-Liebold B, Franke P, Panico M, McDowell R, Morris HR (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* 271:15428-15435
- Stolterfoht H, Steinkellner G, Schwendenwein D, Pavkov-Keller T, Gruber K, Winkler M (2018) Identification of key residues for enzymatic carboxylate reduction. *Front Microbiol* 9:250
- Stothard P (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104
- Subhan M, Faryal R, Macreadie I (2016) Exploitation of *Aspergillus terreus* for the production of natural statins. *J Fungi* 2:13
- Sugiyama H, Ojima N, Kobayashi M, Senda Y, Ishiyama J, Seto S (1979) Carbon-13 NMR spectra of aspulvinones. *Agric Biol Chem* 43:403-404
- Sun WW, Guo CJ, Wang CC (2016) Characterization of the product of a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene using the doxycycline dependent Tet-ON system in *Aspergillus terreus*. *Fungal Genet Biol* 89:84-88
- Survase SA, Kagliwal LD, Annapure US, Singhal RS (2011) Cyclosporin A--a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnol Adv* 29:418-435
- Tagami K, Minami A, Fujii R, Liu C, Tanaka M, Gomi K, Daiiri T, Oikawa H (2014) Rapid reconstitution of biosynthetic machinery for fungal metabolites in *Aspergillus oryzae*: total biosynthesis of aflatoxin. *Chembiochem* 15:2076-2080

- Tanovic A, Samel SA, Essen LO, Marahiel MA (2008) Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* 321:659-663
- Tarcz S (2014) Molecular biological and biochemical investigations on prenyltransferases and NRPS-like enzymes from Ascomycetes. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Tarcz S, Ludwig L, Li S-M (2014a) AstPT catalyses both reverse *N*1- and regular *C*2-prenylation of a methylated bisindolyl benzoquinone. *Chembiochem* 15:108-116
- Tarcz S, Xie X, Li S-M (2014b) Substrate and catalytic promiscuity of secondary metabolite enzymes: *O*-prenylation of hydroxyxanthenes with different prenyl donors by a bisindolyl benzoquinone *C*- and *N*-prenyltransferase. *RSC Adv* 4:17986-17992
- Tello M, Kuzuyama T, Heide L, Noel JP, Richard SB (2008) The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol Life Sci* 65:1459-1463
- Tripathi A, Park SR, Sikkema AP, Cho HJ, Wu J, Lee B, Xi C, Smith JL, Sherman DH (2018) A defined and flexible pocket explains aryl substrate promiscuity of the cahuitamycin starter unit-activating enzyme CahJ. *Chembiochem* 19:1595-1600
- Tsai HF, Wang H, Gebler JC, Poulter CD, Schardl CL (1995) The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 216:119-125
- Unsöld IA, Li S-M (2005) Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151:1499-1505
- Vahedi SR, Lass-Flörl C (2019) Antifungal resistance in *Aspergillus terreus*: A current scenario. *Fungal Genet Biol* 131:103247
- van Dijk JW, Guo CJ, Wang CC (2016) Engineering fungal nonribosomal peptide synthetase-like enzymes by heterologous expression and domain swapping. *Org Lett* 18:6236-6239
- van Dijk JWA, Wang CCC (2018) Expanding the chemical space of nonribosomal peptide synthetase-like enzymes by domain and tailoring enzyme recombination. *Org Lett* 20:5082-5085
- Venkatasubramanian P, Daniels L, Rosazza JP (2007) Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. *J Biol Chem* 282:478-485
- Villiers B, Hollfelder F (2011) Directed evolution of a gatekeeper domain in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Biol* 18:1290-1299
- Viziteu E, Grandmougin C, Goldschmidt H, Seckinger A, Hose D, Klein B, Moreaux J (2016) Chetomin, targeting HIF-1 α /p300 complex, exhibits antitumour activity in multiple myeloma. *Br J Cancer* 114:519-523
- Wackler B, Lackner G, Chooi YH, Hoffmeister D (2012) Characterization of the *Suillus grevillei* quinone synthetase GreA supports a nonribosomal code for aromatic α -keto acids. *Chembiochem* 13:1798-1804

- Wackler B, Schneider P, Jacobs JM, Pauly J, Allen C, Nett M, Hoffmeister D (2011) Ralfuranone biosynthesis in *Ralstonia solanacearum* suggests functional divergence in the quinone synthetase family of enzymes. *Chem Biol* 18:354-360
- Walsh CT, Gehring AM, Weinreb PH, Quadri LE, Flugel RS (1997) Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* 1:309-315
- Walsh CT, O'Brien RV, Khosla C (2013) Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:7098-7124
- Wang M, Beissner M, Zhao H (2014) Aryl-aldehyde formation in fungal polyketides: discovery and characterization of a distinct biosynthetic mechanism. *Chem Biol* 21:257-263
- Wang M, Zhao H (2014) Characterization and engineering of the adenylation domain of a NRPS-like protein: A potential biocatalyst for aldehyde generation. *ACS Catal* 4:1219-1225
- Wang XW, Lombard L, Groenewald JZ, Li J, Videira SI, Samson RA, Liu XZ, Crous PW (2016a) Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia* 36:83-133
- Wang YY, Luo HD, Zhang XS, Lin T, Jiang H, Li YQ (2016b) The substrate promiscuity of a phosphopantetheinyl transferase SchPPT for coenzyme A derivatives and acyl carrier proteins. *Arch Microbiol* 198:193-197
- Weber T, Baumgartner R, Renner C, Marahiel MA, Holak TA (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure* 8:407-418
- Winkelblech J, Fan A, Li S-M (2015a) Prenyltransferases as key enzymes in primary and secondary metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7379-7397
- Winkelblech J, Li S-M (2014) Biochemical investigations of two 6-DMATS enzymes from *Streptomyces* revealing novel features of L-tryptophan prenyltransferases. *Chembiochem* 15:1030-1039
- Winkelblech J, Liebhold M, Gunera J, Xie X, Kolb P, Li S-M (2015b) Tryptophan C5-, C6- and C7-prenylating enzymes displaying a preference for C-6 of the indole ring in the presence of unnatural dimethylallyl diphosphate analogues. *Adv Synth Catal* 357:975-986
- Winkelblech J, Xie X, Li S-M (2016) Characterisation of 6-DMATSM₀ from *Micromonospora olivasterospora* leading to identification of the divergence in enantioselectivity, regioselectivity and multiple prenylation of tryptophan prenyltransferases. *Org Biomol Chem* 14:9883-9895
- Winkler M (2018) Carboxylic acid reductase enzymes (CARs). *Curr Opin Chem Biol* 43:23-29
- Wohlgemuth V, Kindinger F, Li S-M (2018) Convenient synthetic approach for tri- and tetraprenylated cyclodipeptides by consecutive enzymatic prenylations. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:2671-2681

- Wollinsky B, Ludwig L, Hamacher A, Yu X, Kassack MU, Li SM (2012) Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Bioorg Med Chem Lett* 22:3866-3869
- Wolpert M, Gust B, Kammerer B, Heide L (2007) Effects of deletions of mbtH-like genes on clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* 153:1413-1423
- Wong CP, Awakawa T, Nakashima Y, Mori T, Zhu Q, Liu X, Abe I (2018) Two distinct substrate binding modes for the normal and reverse prenylation of hapalindoles by the prenyltransferase AmbP3. *Angew Chem Int Ed Engl* 57:560-563
- Wunsch C (2014) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von Prenyltransferasen und NRPS-Enzymen aus Ascomyceten. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Wunsch C, Zou HX, Linne U, Li S-M (2015) C7-prenylation of tryptophanyl and O-prenylation of tyrosyl residues in dipeptides by an *Aspergillus terreus* prenyltransferase. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1719-1730
- Wyatt MA, Mok MC, Junop M, Magarvey NA (2012) Heterologous expression and structural characterisation of a pyrazinone natural product assembly line. *Chembiochem* 13:2408-2415
- Xu HW, Xu C, Fan ZQ, Zhao LJ, Liu HM (2013) A facile synthesis, antibacterial activity of pulvinone and its derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 23:737-739
- Xu W, Gavia DJ, Tang Y (2014) Biosynthesis of fungal indole alkaloids. *Nat Prod Rep* 31:1474-1487
- Yang G, Zhang Y, Lee NK, Cozad MA, Kearney SE, Luesch H, Ding Y (2017) Cyanobacterial Sfp-type phosphopantetheinyl transferases functionalize carrier proteins of diverse biosynthetic pathways. *Sci Rep* 7:11888
- Yang K, Li SM, Liu X, Fan A (2020) Reinvestigation of the substrate specificity of a reverse prenyltransferase NotF from *Aspergillus* sp. MF297-2. *Arch Microbiol* 202:1419-1424
- Yang X, Yang J, Jiang Y, Yang H, Yun Z, Rong W, Yang B (2016) Regiospecific synthesis of prenylated flavonoids by a prenyltransferase cloned from *Fusarium oxysporum*. *Sci Rep* 6:24819
- Yano K, Horinaka M, Yoshida T, Yasuda T, Taniguchi H, Goda AE, Wakada M, Yoshikawa S, Nakamura T, Kawauchi A, Miki T, Sakai T (2011) Chetomin induces degradation of XIAP and enhances TRAIL sensitivity in urogenital cancer cells. *Int J Oncol* 38:365-374
- Yeh E, Kohli RM, Bruner SD, Walsh CT (2004) Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *Chembiochem* 5:1290-1293
- Yeh HH, Chiang YM, Entwistle R, Ahuja M, Lee KH, Bruno KS, Wu TK, Oakley BR, Wang CC (2012) Molecular genetic analysis reveals that a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene in *Aspergillus nidulans* is responsible for microperforanone biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:739-748

- Yonus H, Neumann P, Zimmermann S, May JJ, Marahiel MA, Stubbs MT (2008) Crystal structure of DltA. Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J Biol Chem* 283:32484-32491
- Yu JH, Leonard TJ (1995) Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J Bacteriol* 177:4792-4800
- Yu X, Li S-M (2012) Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Methods Enzymol* 516:259-278
- Zettler J, Mootz HD (2010) Biochemical evidence for conformational changes in the cross-talk between adenylation and peptidyl-carrier protein domains of nonribosomal peptide synthetases. *FEBS J* 277:1159-1171
- Zhang J, Liu N, Cacho RA, Gong Z, Liu Z, Qin W, Tang C, Tang Y, Zhou J (2016) Structural basis of nonribosomal peptide macrocyclization in fungi. *Nat Chem Biol* 12:1001-1003
- Zhang N, Castlebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, Rossman AY, Rogers JD, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Sung GH (2006) An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* 98:1076-1087
- Zhang Q, Li HQ, Zong SC, Gao JM, Zhang AL (2012) Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites. *Mini Rev Med Chem* 12:127-148
- Zhang Y, Wu W, Cai L (2017) Polyphasic characterisation of *Chaetomium* species from soil and compost revealed high number of undescribed species. *Fungal Biol* 121:21-43
- Zhao W, Fan A, Tarcz S, Zhou K, Yin WB, Liu XQ, Li S-M (2017) Mutation on Gly115 and Tyr205 of the cyclic dipeptide C2-prenyltransferase FtmPT1 increases its catalytic activity toward hydroxynaphthalenes. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:1989-1998
- Zhou K, Wunsch C, Dai J, Li S-M (2017) *gem*-Diprenylation of acylphloroglucinols by a fungal prenyltransferase of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Org Lett* 19:388-391
- Zhou K, Zhao W, Liu X-Q, Li S-M (2016) Saturation mutagenesis on Tyr205 of the cyclic dipeptide C2-prenyltransferase FtmPT1 results in mutants with strongly increased C3-prenylating activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9943-9953
- Zhu J, Chen W, Li YY, Deng JJ, Zhu DY, Duan J, Liu Y, Shi GY, Xie C, Wang HX, Shen YM (2014) Identification and catalytic characterization of a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) enzyme involved in the biosynthesis of echosides from *Streptomyces* sp. LZ35. *Gene* 546:352-358
- Zubenko GS, Jones EW (1979) Catabolite inactivation of gluconeogenic enzymes in mutants of yeast deficient in proteinase B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4581-4585
- Zwahlen RD, Pohl C, Bovenberg RAL, Driessen AJM (2019) Bacterial MbtH-like proteins stimulate nonribosomal peptide synthetase-derived secondary metabolism in filamentous fungi. *ACS Synth Biol* 8:1776-1787

7. Anhang

Tabelle 7-1: Übersicht der Sequenzinformationen von den ursprünglichen und re-identifizierten NRPS-ähnlichen Gene

Genname (Accession)	Proteinname	Genom Annotation		bestätigt durch mRNA	
		Genposition	vorhergesagte Proteingröße	Genposition	Proteingröße (AS)
ATEG_02004 (NT_165926)	EAU36966 (ApvA)	330691...328739, 328707...327913	918	330691...327913 (bp 328734 fehlt)	925
ATEG_03563 (NT_165927)	EAU36837 (MelA)	2155631...2154053, 2153953...2153736, 2153575...2152853	839	2155631...2152853 (bp 2153533 fehlt, T2153970C)	925
ATEG_02815 (NT_165927)	EAU36089 (BtyA)	107521...104737, 104636...104608	937	107521...104728	930
ATEG_08899 (NT_165936)	EAU31031 (PgnA)	1126983...1124143	946	1126983...1124143 (A1125756G, T1125218C)	946
ATEG_03090 (NT_165927)	EAU36364 (AtrA _{At})	855035...852504	844	855035...852276 (bp 853013 fehlt)	920

Tabelle 7-2: Vergleich der Aminosäuresequenz von den NRPS-ähnlichen Enzymen aus dieser Arbeit

	MelA	ApvA	AtqA	PgnA	AtrA _{At}	AstA
BtyA (EAU36089)	43%	42%	42%	41%	43%	41%
MelA (EAU36837)		66%	42%	49%	57%	43%
ApvA (EAU36966)			44%	48%	56%	43%
AtqA (EAU39346)				39%	44%	70%
pgnA (EAU31031)					48%	39%
AtrA _{At} (EAU36364)						46%
AstA (EAQ91725)						

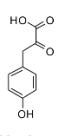


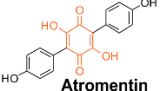


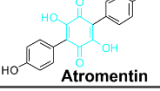


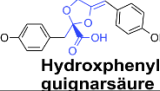


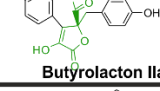



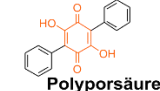


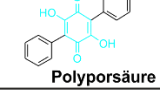


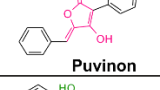


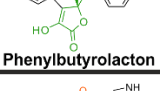
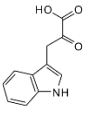


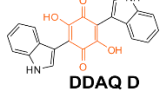


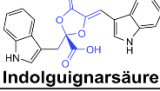


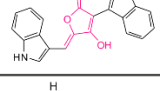


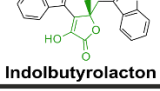
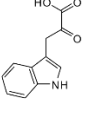


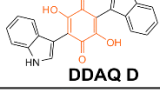


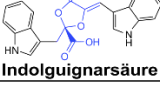


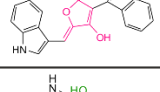


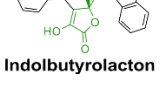
Substrat Aktivierung	Substrat Bereitstellung	Kernstruktur bildende Einheit	Erwartetes Produkt	Expressions konstrukt	Ausbeute (mg/l)
 4-Hydroxy- phenyl- Pyruvat	 ApvA	 AtrA _{KL}	 Atromentin	pEH49 / pEH58	0.7 / 0.6
	 ApvA	 AstA	 Atromentin	pEH48 / pEH59	0.5 / 0.8
	 PgnA	 PgnA	 Hydroxphenyl- guignarsäure	pEH50 / pEH60	8.6 / 0.7
	 BtyA	 BtyA	 Butyrolacton IIa	pEH118 / pEH119	30.5 / 25.3
 Phenyl- pyruvat	 PgnA	 AtrA _{KL}	 Polyporsäure	pEH52 / pEH63	~0.04 / <0.01
	 PgnA	 AstA	 Polyporsäure	pEH51 / pEH64	~0.04 / ~0.04
	 PgnA	 ApvA	 Puvion	pEH53 / pEH61	0.06 / 0.06
	 PgnA	 BtyA	 Phenylbutyrolacton	pEH120 / pEH62	0.6 / 0.1
 Indol- pyruvat	 AstA	 AtrA _{KL}	 DDAQ D	pEH72 / pEH67	- / -
	 AstA	 PgnA	 Indolguignarsäure	pEH73 / pEH68	- / 0.4
	 AstA	 ApvA	 Indolguignarsäure	pEH70 / pEH65	- / -
	 AstA	 BtyA	 Indolbutyrolacton	pEH71 / pEH66	0.5 / 0.5
 Indol- pyruvat	 AtqA	 AtrA _{KL}	 DDAQ D	pEH114 / pEH117	- / -
	 AtqA	 PgnA	 Indolguignarsäure	pEH115 / pEH93	<0.01 / <0.01
	 AtqA	 ApvA	 Indolguignarsäure	pEH112 / pEH116	- / -
	 AtqA	 BtyA	 Indolbutyrolacton	pEH113 / pEH97	- / -

Tabelle 7-4: Übersicht über die Domänenrekombination von den NRPS-ähnlichen Enzymen, das erwartete Produkt und deren Ausbeuten

TdiA	-----MAPSKTEIAPLRAAKYPFNGNIV	DALRHAAA-HTDEGIIVYHPN	42
AstA	-----MGSLAVSGVDYDFDNII	DALKHTAA-HTTEGIISYSPA	37
AtqA	MT-----RTEILSNGHAEPASNGMVQYFDFNV	VDALRAA-A-NTTEGIAYQTN	47
MicA	-----MVGSVVEAHRQSVGCLRNLSQLLAW--	ASNTSGGLIFYSRE	39
BtyA	-----MTKIDLINLLDHAADTVAASGILIYSP-		27
PgnA	MN-----KKLKLFSMPGAQ--	TSQIVIMLFQSLHLHLEAIASREPTRYIITYSI-	47
AtrAAat	-----MS	FKNLQQLLKEAAAQERCGRVICYSS-	27
MelA	-----M	QPSLIPSLLETAARNGDGRVILYSQ-	27
ApvA	-----MT	LNNLQALLRRVAAREDSGHVVVYGM-	27
AtrA	MAPTAVFSNPAT--NPVANLK--ASVKTA	EGVPATLNDLLLQATEMYPSEHLSFITSS	54
Nps3	MAPAPT-SVPLVSQPNVISDLKTALAVQGSASDH	PRTLHQLLSQAAERYPLQQLGFITSSS	59
InvA2	MTPIAVTPVA--PVDIIYDLK--H-TERAT	ESSPVTLLDVFSRAVSQYPNHELSFITSS	54
InvA5	MTPIAITPVA--PVDIIYDLK--H-TERAT	ESSPVTLLDVFSRAVSQYPDHLSFITSS	54
InvA1	MSFVAT---TTSVTPDVISSLKTSF-SAGQTSY	IPSTLFDVLSYAAERYPSHELGFITSS	56
GreA	MASIAVTTTTTTTTAEFVTSRPR---TSI	VFEQPNLTLDVIAQAVDSYPLHELGFITSS	55
RalA	MTT-----VA--VESSTFHVQEADHFPST	TTSDLLLQAAARYPESGLRFVDDH	46
Bth110240	MTA-----STLDLPRDCEHA	LR--AASPPNIVDLLRAARLHPHTGVRFIAAE	46
EchA	-----M	RAARDHAHSGVRYLVGP	18
:			
TdiA	SIST-SSPPQTVSYKDLLHQAEANATRLLOQKLCSPKSIVLVHFESALDSIVVWYSVLLA		101
AstA	GAGE-APVARTVSYRELLDTAEANAGKLQKLSATKTGSSVVLVHFDDALESIVVWYSVLLA		96
AtqA	NSGSETTPAQHISYKELLRTAEANALLQSKHLTPKQPVVHSDNAVDSMIWYWSVLLT		107
MicA	DD---VLTS	TRISYAELLADAGEKARLIGQITGLSSESIIHLHFDQREVIEWFWAATLA	96
BtyA	GN---V	ESPHRLTYAELRDAAQONARRLCMEGFAPGSLVLLHLDGYRDNMIWLWSLIYA	84
PgnA	GN---THTPEIFSYSDLLQSARKAAGALRFKYHVVPGSVVLHFNHWNMLWFWATLLA		104
AtrAAat	GN---LQNPTSRSYHELMQEAQRASWALRTATCARHGSVALLHFDHSDHWSILWFWATLLA		84
MelA	GN---REDPRSITYRDLLETASKASVAVHNHONYTPGAAVLLHFNHLDNIWVFWAVLLA		84
ApvA	GN---TKAFKSYSYQDLLRVAIKASVALRKTSDLHPGSGVILLHFDNHNWDNIWVFWAASFA		84
AtrA	AH---DSSVQARTFQDFNQVRNLSALAA-WKKPAGEVVVVYLTCHEDNMSAVWACLLA		110
Nps3	AH---DSSIQTKSYSTFNQHVRLNARALTD-WKKPVGSIIVVYLTCHEDNMAAVWACLLA		115
InvA2	AH---DSTIHTKTFAEFNQDVHALAQAMRA-WGKPTGSGVIVVYLTCHEDNMAAVWASLLA		110
InvA5	AH---DSTVHTKTFAEFNQHVHALAQAMRA-WGKPTGSGVIVVYLTCHEDNMAAVWASLLA		110
InvA1	AH---DSSIQTKTFSLFNAQVRNLGRALLD-LNKPGAGSIIVVYLTCHEDNMAAVWACLLA		112
GreA	AH---DSSIQTKTFSAFNQYVRNLARAMLE-WGKPTGSGVIVVYLTCHEDNMTAVWACLLA		111
RalA	GA---GEVD-CLSYFKLLQEAKCILAEALRV-LGRRPGDKVVLLERARDFVPAFWACVLG		101
Bth110240	SE---HKGA-FVTYPPELLDEARRILGGLRA-RGYRSGMKVALLLEHASDFIPAFWACALG		101
EchA	TA---GESV-WQPYPELLESALGLLSALRD-RGLRPQDKVALLLDROPEFLTIVLWACLLG		73
: : . : : : *			
TdiA	GGIPALTGPGMFSQNPADRERHLRHLSETLNSPVCLTRPALLAPFEEQTADDRIKARTVD		161
AstA	GGIPAVTSPAMFSQNEADRQKHLNHLKYTFNGPLCLTRRALLEPFEEHASEKRIDTLAVE		156
AtqA	GAIPTMTGPGMFSQDAVERKKHLLHLHRTLDAPLCLTRRALMGPFENENAGL--LQCLAFE		165
MicA	GYLPAISTP--FVDDTARRKAHLHLHAQLNQPVVLTSKRLVPEFLGLEEL--RLHDFE		151
BtyA	GCIPVMSTP--FAHHEEHRRSHLLHLQSLLRDPICLTRQGLEAQFPDPVGF--RLCNIE		139
PgnA	DCIPAMSTP--FSNNPETRLRLHLKHLSTTLRSPKCLTTASLAAEFAGQEYI--TPICVQ		159
AtrAAat	GCVFVMSTA--LPNNTSLRTAHLEHLSRTLNGPLCLTRARMAPEFSEQTCTI--EPIAVE		139
MelA	GCIPAITPA--FSNNPVQRVANLEHLSSTLITDWCLTSQALLVEFAGQDAI--EPVSVE		139
ApvA	GCLPAISAS--FSNDASQRTAHIERLSTTLMHPLCLTNERIMADFAGQDAV--QPLAVE		139
AtrA	GLVPCLQPA--LSAQQEHKEGHIAHIRKLFSGSATWLTNDAGAMQLDTIKGL--DVHLFS		165
Nps3	GYIPCLQPA--LSAQQSHKEGHINHIKNLFLSATWLTNEIGAEQVMSVDGI--DIHLFS		170
InvA2	GYVPCLQPA--LSAQQAHKEGHVGHIKNLFSSATWLTNESGAEQVQSISGL--DIHLLS		165
InvA5	GYVPCLQPA--LSAQQAHKEGHVGHIKNLFSSATWLTNESGAEQVQSISGL--DIHLLS		165
InvA1	GYVPCLQPA--LSAQQAHKEGHVGHIKNLFSGSATWLTNEAGAEQVSSIAGL--EIHLLS		167
GreA	GFVPCLQPA--LSAQQAHKEGHVGHIAHIRKLFSGSATWLTSELGAEQINSISGL--EVHLLS		166
RalA	GVIPCPVAP--IRHDPMRWQKTLEHIDALLDSPLFITHTLTKAGLPDTMEV--V--TLD		154
Bth110240	GFVPCLPLP--IRNDPERWAKHLAHVDTLLDHPLLVTTTEALNNDLPGGASA--V--NLN		154
EchA	GFVPCPMVP--VSGDPAWAAQLTHVNGLLGGPLLVTTTEATRAELPEVPGL--AVAVVE		128
. : * . . : : : : *			

Abbildung 7-1: Vergleich der Proteinsequenzen der NRPS-ähnlichen Enzyme mit Clustal Omega. Die Domänenregion wurde mit dem NCBI conserved domain prediction Program bestimmt. A-Domänen wurden in grün, T-Domänen in rot und TE-Domänen in blau hervorgehoben. Die als Rekombinationspunkt ausgewählten Aminosäuren sind in gelb hervorgehoben. Die in den roten Kästen hervorgehobenen Aminosäuren wurden als Teil der katalytischen Triade vorgeschlagen (Braesel et al. 2015).

TdiA	EILAAPEIA--DVADAPLPALTPSSTDMLALMLTSGSSGNAKAVPLTHQQLLAAFRGKST	219
AstA	DFDKEPA-----TSTRRAFKPSAADVVALMLTSGSSGNAKAVPLSHEQLFAAFRGKTE	210
AtqA	DLSPSPDGS--N--ASLPSPINPSPMDVAALMLTSGSSGTAKAVPIHQVLAALRGKTA	221
MicA	SLSSAAKD----GLIQYLGQVQKLAEDVAVLMLTSGSTGSAKAVPLRHGQLLTAIQGKST	207
BtyA	SISGGS-NPFTSPRLGQPPGQDDNVDDIALMLTSGSTGHAKAVPLTHSQLLSALAGKER	198
PgnA	SLDYENLVHL-----PIKEGGDIAVLMFTSGSSGHCKVVPLTHEQILASLSGKAW	209
AtrAAAt	TFDMQTSSK-----EDHVDSAPDDTAVMMLTSGSTGRPKAVCLTHGQILSSIIVNKLS	191
Mela	TLGWEKASPSNT----ASVKAKPTDTALLLFTSGSTGKSKAVCLSHFQIVSAIAGKLS	194
ApvA	TLVLNGDVSFEAL---PQEHPEPSLSDDALLLFTSGSSGNSKGVCLSHGQILASISGKYA	196
AtrA	DLIASAE--KSS--VAANYVARQSQPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVHTHRTIIINACIAKGA	222
Nps3	DLKLAAE--GYN--VPADWAAVEAKPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVHTHRTIIASCYAKGQ	227
InvA2	ELKASAE--A---GVDFQAHQPNSDDEAILFLTSGSTGFSKAVVHTHRTILAACHAKGE	219
InvA5	ELKASAE--A---GVDFQAHQPNPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVHTHRTILAACHAKGE	219
InvA1	ELKIAAE--GYS--VSADWTARTVQPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVHTHRTILAACYAKGE	224
GreA	ELKSSAE--KFT--VAADWVAYEAKPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVHTHRTILAACRAKQ	223
RalA	ALRHAHS-----VSLVPVHVPARVNDPAVFVLTSGSTGNSKAVVLTGHNLLASMAGKNG	208
Bth110240	ALRASL-----PDASTHVAQPSDPAVFVLTSGSTGNAKAVVLTGHNLLASMAGKND	205
EchA	ELRAEDASGAE-RGQPPAIHSAAPDDLALLVLTSGSTGNSKAVMLTHGNI LASMAGKAG	187
	: * :.:****:* * * * :. : *	
TdiA	AASLRFPRSPFLSWVHMDHVNANLVHCHIFAIVSGISQIQVPAPDLLINPAQLLNLSRHR	279
AstA	AA NLTFPDSPFMSWVNMDHVNANLVHCHLFAIASGVSIQVPAANVLVDPAQLLNLSRHR	270
AtqA	VAQLSHPTS PFLSWVHMDHVNANLVHCHLFAIVAGVSQVQVPAANVLVDPMQLLNLSRHR	281
MicA	HHGTL-PGDVFYNWVGLDHVASLTEIHLHALILGSDQVHTAASELLRNSLQFVRLLDTHK	266
BtyA	FLQLR-QHGPSLNWVAFDHIASLAEMHFHPIFACIDQVHVAADVITDPLILLELIHRHR	257
PgnA	TFPLP-DNTAQLNWVGMNHVASLVEVHLFSIYTHSDQVHIPTVEVLSHVTFLDLIHRHR	268
AtrAAAt	VVPLR---GPFMNWIRLDHVAALTEIHLPAILSNKQDVHVQVSADLLANPVEFIRLASEHR	248
Mela	VVPLP-EQSSFLNWVGLDHVAAIIEIHLQALYADLDQVHVPGSDVISDPIWFLDLMATHR	253
ApvA	VRPLP-DNTSFLNWVGLDHVAAIVEIHLQAMYALKTQVHVPAADILSSPATFLQLLEKHR	255
AtrA	NYRLT-PQTNILNWVGFDFHVASLSEMHIAPLLYGCSQLHVHASAILSDPLRFLRLIDERS	281
Nps3	SYGLT-SETNVLNWVGFDFHVASLSEMHITPLLFSGSYQLHVHASTILSDPLSFLRLIDDKS	286
InvA2	SYGLT-SESKIMNWVGFDFHVASLSEMHIAPLLYGASQLHVHASAILSDPLRFLRLIEEKS	278
InvA5	SYGLT-SESKIMNWVGFDFHVASLSEMHIAPLLYGASQLHVHASAILSDPLRFLRLIEEKS	278
InvA1	AYGLT-SESNI LNWVGFDFHVASLSEMHIAPLLYGASQLHVHASAILSDPLRFLRLIDEKS	283
GreA	SYGLT-SESQVLNWVGFDFHVASLSEMHITPLLYGASQLHVHASAILADPLRLRLIDEKS	282
RalA	YQRLG-SDDVTLNWISFDHVAALLEAHLLPLSVGAAQIHVDSAPILSDPLRFLRLISDHR	267
Bth110240	RQQLA-GADVTLNWISFDHVAALLEAHLLPLVYGAVQLHVEAAAVLTDPLRFLRLVSRYR	264
EchA	KQRLT-ATDTTFNWISYDHVAALLEAHMLPLVYGAEQLHAEAAVILEEPLRFLRLISRHK	246
	.*: :*: * . *: : *:: : : : : :	
TdiA	VSRTFMPNFLCAKLRRQLESGSPE--YILDPGLNLET-LYIDTGGEANVTEVCIALQSL	335
AstA	VSRTFAPNFLAKLRRQLEAGKTD---TLDADLNLOT-LFLDTGGEANVIEVCAALQPL	325
AtqA	VSRTFAPNFLFAKLRRQFDAGRTD---SLDADLNLA-LYLDTGGEANVIDVCAGLQPI	336
MicA	VAYTFAPNFFLT KVLDLRENPT-----FTADLSSLKALISGGESNVVVTCDKL TRE-	318
BtyA	VGITFAPNFLAKLLDSLREPS--PSS-RPWDLSCLMHLLSGGEANVVDTCARLARRL	313
PgnA	VSRTFAPNFFLAKLRAALSADDTL--AK--YTGSLSNLRYIVSGGEANVTQTINDLAQM	323
AtrAAAt	VAKTFAPNFFLATLRDALCATQ---HDS-PKWDLSGL-YIFSGGEGNVTRTCDEISKL	301
Mela	VSRTFAPNFFLARIRDALVQNARS--ASP-RQWDL SGLRYVASGGEANTTKTCDELSQL	309
ApvA	VSRTFAPNFFLAKLRDLLQENDSL--PEP-RRWDLRSLEYVASGGEANVTTKTCDRLSEY	311
AtrA	IDIAFAPNFLAKMVRDLEKRTD----LHGKFDLSSLRMNSSGGEAVVSKTAVAFVQL	335
Nps3	INIAFAPNFLAKLARDLEKRSE----LYGAFDLSSVKRINSGGEAVVSKTAKIFVTV	340
InvA2	IQLAFAPNFLAKLTRDLEKRSD----LFGKFDLSSIKRINSGGEAVVSSTAQAFART	332
InvA5	IQLAFAPNFLAKLTRDLEKRSD----LLGKFDLSSIKRINSGGEAVVSSTAQAFART	332
InvA1	INVAFAPNFLAKLTRDLEKKTE----LFGSFDLSSVTRINSGGEAVVSKTAKAFVAT	337
GreA	IELAFAPNFLLSKLTRDLEKRTD----LFGSFDLSSIKRINSGGEAVVSKTAQAFAT	336
RalA	VSMTFAPNFLFGQINAALQAKDAQ--AQAKHSFNLSRLRHIIISGGEAVVETGHRFIEL	324
Bth110240	VTMTFSPNFLFGQLNAALEAMGDEALAAWRGAVDLSSLRHVVS GGEAIVVATGQRFDL	323
EchA	VTMTFTPNFLGPLNSSAHEMAEEISA-GGEGDL SALRHIVSGGEANVVATGEAFLAH-	304
	: : * * *: : . * : : * * . . : :	

Fortführung von Abbildung 7-1

TdiA	LSRYGAPD----NVFKPSFGMTETVAGCIFNSH-CPSYDHAQRHEFACLGKMPGVRMRV	390
AstA	LARYGAPA----DVFKPSFGMTETCAGCIFNTE-CPSRDQANKSEFASLGQCM PGVQMRI	380
AtqA	LARYGAPA----DVFKPSFGMTETCAGCIFNSH-CPSYDQARLHEFASLGTMPGVRMRV	391
MicA	LRRRGVQA----EVIRPGFGMTETCAGSIYSRA-CPSYDIRQSLEFASLGSCIPGMHMRV	373
BtyA	TQDYGVPS----TCIKPAFGMTETCAGCSFNDR-FPTYETVHMLDFASLGRGVKGVQMRV	368
PgnA	LKKCGAVS----NVIVPAFGMTETCAGAIYNTS-FPQYDVEHGLPFASVGS CMPIQVRI	378
AtrAAt	LGRYGAPP----NVIVPGFGMTETCAGAINNTS-CPWYDIERTSDFASLGT CMSCIRMRI	356
MelA	LKSFGAPL----NVIVPGFGMTETCAGAI FNTN-CPDYDKKHGLEYSVGS CMPIFMRV	364
ApvA	LVAFGAPK----DVIVPGFGMTETCAGSIFNTR-CPEYDKSRSAEFASVGT CMPI SMRV	366
AtrA	LKKLGRNPSKVSFKVAAGFGMTETCAGCIYDVVDLAEN--SPKHEFLALGAPVHGCEMRI	393
Nps3	LKALAKDPSKVSFVVSAGFGMTETCAGCIYDPIDLSVI--NPMHEFLDLGRPIQCEMRI	398
InvA2	LKNLAKDG-DASFVISAGFGMTETCAGCIYDPINVLET--PPSYEFLELGT PVAGCEMRV	389
InvA5	LQNLAKDG-DASFVISAGFGMTETCAGCIYDPINVLET--PPSYEFLELGT PVAGCEMRI	389
InvA1	LKNLSRDPSPKVSFVISPGFGMTETCAGCIYNPADVSTS--EPNYEFLELGT PITGCEMRI	395
GreA	MKQLSKNPSAVSFVISAGFGMTETCAGCIYDPVDVLKN--KPAHEFLDLGRPINGCEMRI	394
RalA	LAPYGLVA----SALWPAFGMSETCAGSIYSRN-FPDG--DQREFASLGPVAGLQIRV	377
Bth110240	LAPCGLAR----DALWPAFGMTETCAGSVYSRE-FPEG--DAGREFASLGLPVAGLQMRI	376
EchA	YAPYGLRE----AALWPAFGMTETCAGSIYNRA-FPAT--DAGQEFANLGT PVEGLRIRV	357
	. . .***. ** . : : * : : **	
TdiA	TRLDTPSEEAAPGERGSLEVTGEVVFVKGYNNPAATAEAFSTSGWFRTGDLAFIDSNGNL	450
AstA	SRLDGA-GDAATGERGSLELKGDIIFKGYNNNTATTTADFTADGWFR TGDLAYLDASRCL	439
AtqA	SRLDGS-GEAAPGERGHLEITGEAIFHGYYNNPTATADFTADGWFR TGDLAYIDAGGHL	450
MicA	MSITEPGKLAAPGESGELQVAGPVVFDHYNDETATRNaFTPDGWFITGDLGWIDDAGNL	433
BtyA	TSLSTGQPVDDHSEVGNLELSGSPSVFRGYNNNSQATRDSFTPDGWFR TGDLAMIDAGGQL	428
PgnA	VQLNGNGNSVPPGTVGNLEICGPVVLKGYFNDPAATKSTFTNDNWFKTGDLAFVDDNGML	438
AtrAAt	TDDSGGNTCVCSPGETGNLEVTSAGVFEKEYFNPNPSATADFTSGWFKTGDRGLIDTNGYL	416
MelA	TNQOGD--PLPPGEMGSLELAGPVVFRQYLLNPAATQESFTMDGWFKTGDCGTLDENGYL	422
ApvA	TDLSNN--ALPSGEIGHLQLTGPFVFKRYFNNTSATQEAFTPDGWFKTGDMGICIDENGCL	424
AtrA	VDPEDGATPRSDGQPGELQVRGPMFVRYNNPEATKSSFVEGGWYRTGDIGIIE-NGNM	452
Nps3	VDPEDGITLRPDGESGELQVRGPMVFARYNNPQATSSSFVEGRWYRTGDIGIIE-KGVM	457
InvA2	VNPEDGVTPRPDGESGELQVRGPMVFVRYNNPEATSSSFVEGGWYRTGDVGIVE-QGKM	448
InvA5	VNPEDGVTPRPDGESGELQVRGPMVFVRYNNLEATSSSFVEGGWYRTGDVGIVE-QGKM	448
InvA1	VNPEDGVTPRVDGESGELQVRGPMVFSRYNNAEATASSFVEGGWYRTGDVGIVE-NGVM	454
GreA	VDPEDGATLRPDGESGELQVRGPMVFVRYNNAEATSSSFVEGGWYRTGDVGIIE-NGVM	453
RalA	VDESG--APLPDGETGELQLRGPMVFEGHYHKNEEATRQAFTEDGWFRSGDLGQIH-GGQL	434
Bth110240	ADDRN--NVLPEGEAGEFQVRGPMIFQRYHNNAEATRAAFTSGWFR TGDLGRIE-RGRL	433
EchA	ADDDH--RALPTGEIGELQLSGPMITPGYYNNHDATEEAFTPDGWFRSGDLGRID-EGRL	414
	. * : : * : * : : ** : * . * : : * . : :	
TdiA	HLDGRTKEMININGVKYLPYELDAALEQAQIPGATPSYFCTFSSRDATMDTEVVVLYLP	510
AstA	HLDGRTKEMININGVKYLPHELDASLEQAEIPGATPSYFCCFGRDAGMDTEAVAVLYLP	499
AtqA	HLDGRTKEMVNINGVKYLPHELDAALEQAEIPGATPTYFCCFGRTRAAMDTEVVAVLYLP	510
MicA	NLAGRTKDTIIVNGVKSSTELEAAIEEEAVSGLVRSFTVVVPTRP PGSATEEIAVVYSP	493
BtyA	VLGRSKELICINGAKYLPHEVESAIEDAKVRGVTPGFTICFGYRPAKAQTESLAVVLYLP	488
PgnA	VLAGREKDSIIVNGANYSPHDIESAIDEANIPGLISGFTCCFTFPSPADTEEVIIVLYLP	498
AtrAAt	HLA GRLKETMIINGVKYSPHEIESVLDESNI PGLTPSYNCCFCSFP PGAETEVIICLVLYLP	476
MelA	VLGGRAKETIIINGVKYSPHEIETAVEEHNKGLSRSTCCFSSLSPGAETEIVLVLYLP	482
ApvA	TLTGRAKENMIINGVNHSPEIETALD--KIPGLTPSYSCCFSPFP SGGETEEICVVLYLP	482
AtrA	RLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQ--TVQGVTHSFLAAAPYRAPGQETEGFVVFYAP	510
Nps3	RLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQ--LVEGVTHSFLAAAPYRAPGQETEGFVVFYSP	515
InvA2	RLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQ--TVEGVTHSFLAAAPYRAPGQETEGFVVFYSP	506
InvA5	RLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQ--TVEGVTHSFLAAAPYRAPGQETEGFVVFYSP	506
InvA1	RLSGRIKETVIVHGVSYGIPELETYLQ--TVEGVTHSFLAAAPYRAPGQETEGFIIFYAP	512
GreA	RLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQ--TVEGVTHSFLAAAPYRAPGQETEGFIIFYSP	511
RalA	RLVGRSKDSIIVSGANYFSHELEVALE--QLDGIERSFVAAFPTRPKGVDTELLVVFAT	492
Bth110240	WLVGSKDSIIVNGVNYFSHELETTLE--ALDGVKPSFVAAFPTRGAGDESEQLVVTFTP	491
EchA	TLVGSKDSIIVNGVNYFSHEIEAALE--QLDDVAGGYVAAFPTRRPGSDTEQLVIAVSP	472
	* ** * : : : * . : : : : : : : : * . :	

Fortführung von Abbildung 7-1

TdiA	SYVESDDEARF---STQSSIIRVVAMHTRSRRPR-VVPLRPQDMPKSTLGKLSRAKLKTAL	566
AstA	SYDLSDDAARF---ETQRNIARVSVLHTRSRRPR-VVPLRAQDMPKSTLGKLSRAKLQAGL	555
AtqA	AYDEADDAARF---DAQSSIIRLISMYTHSRPR-VVPLRRREDMPKTTLGKLSRAKLQAAL	566
MicA	AYAPEDYHARY---ETAQVISIKTVSLLTGTPARLIPLPQSLLKSSLGKISHSKVRAAL	550
BtyA	AYEEADVSR---QAQNAIIRVGLIMTGTRPY-VLPLDAHTLVKSSLGKISRNIKTGL	544
PgnA	NYTPADTVRRS---ETAAAIRKVAMMSVGVRAT-VLPLDRTMLEKSTLGKLARGKIKAA	554
AtrAAt	TYPEEDIRARI---QTTDAISKIVMLTGSRPV-IIPLDKGLLQKSALGKLSRSSIKASY	532
MelA	TYAPEDIPARA---ATADAISKVVLMSTGSRPH-IIPLEQALLPKSTLGKLSRSKIKAA	538
ApvA	TYSRDDLAARA---QTADAISKTVLMSTGSRPH-VLPLEREALPKSSLGKLSRAKIKAA	538
AtrA	TFDLQGGDDASKKLSETHRAIKDVSVKMMTLPPQHIVPIPMQMEKTTLGKLSRARLLSQF	570
Nps3	TFDLNEEDASNKLAATHRALRDIVSKMITLPPQQIIPIDQMEKTTLGKLSRARLLTLF	575
InvA2	TFDLDSADAPAKLFATHRALRDIVSVKLITLPPQQIIPINQMEKTTLGKLSRARLVNLF	566
InvA5	TFDLDSADAPAKLFATHRALRDIVSVKLITLPPQQIIPINQMEKTTLGKLSRARLVNLL	566
InvA1	TFDLYGEDASSKLFATHRALRDIVSKMITLPPQHIVPIPVNQMEKTTLGKLSRARLTGLF	572
GreA	TFDLNGADASTKLFATHRALRDIVCKMITLPPQFVVPVPIPVNQMEKTTLGKLSRARLISLF	571
RalA	TIPLNDEARLHQL---NVAIRNTTILLWGFRPALILPLPKTDFPKTSLGKIQRATLRKRL	549
Bth110240	SFPLDDEDALYRL---VIAIRNSTILLWGFRPALILPLPEDEFPKTSLGKTQRAIMRKRL	548
EchA	EPADDDEAGLHRM---ITAVRSTVVIHWGFRPFLILPLPKDAFPKTSLGKTLRRMRQRL	529
	: : : : : *	
TdiA	EEGQFATQQQINDEAIRRYQQKTRASPETPDEAVILDTIKEQLEIRSDDDSGVNDLSILS	626
AstA	ESGAFKAQQEANDAAVKRYRLATRSEPENDAETAILDIVRQQLELSA-EDDFGVNDSVLA	614
AtqA	EAGQFAAYEAANEAAIRRHRTMRGEPASAEETILSIIREQLEIPE-ADDFGVNDSILS	625
MicA	ESGEYASIERADQLILAQYRFKWRPAKSDSEKAVQKALVEFLQV-P-AEGINMDDSIYD	608
BtyA	ESGAFQAFEEETNNRLLKLRQSTPVVPAGNETETLLAAALHVFRV-T-ADEFGVETPMFA	602
PgnA	ERGDKSYQEANEQMMALHHKVSHHQPRSGLEQSLLGVFTRTIPENL-TEDFDVLTSIFD	613
AtrAAt	EKGEYKAYQDTNNSHLVKMYRQAMRTPPKDELESLAIFVDSLEL-S-EEFEDVQTPVFD	590
MelA	ERGEYRTHDSINRSLIARHRQATRASPKNDFEKGLEIFLRSFKI-S-EDEFVQTPVFD	596
ApvA	EKGEYATYQNANNELMRRYRESTRAPQNDLEKTLLEVFTSLSI-T-DDAFDVKTPIFD	596
AtrA	VOGALAKHVARAEELISMARGASFTVPTDDEKALAAIYAGIFNL-Q-SNEVSARDNFFE	628
Nps3	KQGEELAKHIAADELLSEARGATFVVPATITETAFAKIFAGVFNL-S-TDDISAADNFFE	633
InvA2	KQGEELAKHIDRAEELVSIARGASFVAPSTETEKTLAGIYAGIFNL-S-VGDMSASENFFE	624
InvA5	KQGEELAKHIDRAEELVSIARGASFVAPSTETEKTLAGIYAGIFNL-S-VSDMSASENFFE	624
InvA1	KQGEELAKHIAAEELLSEARGASFVTPQTETETLAAIYAGIFNL-E-VADVSATDNFFE	630
GreA	KQGEELAKHIAAEELLSEARGATFVAPSTETEKALAKIYAGIFNL-A-ESEMSASDNFFE	629
RalA	ENGEFSETIAYIEKMTERRQ-MGGYTPAADAIESAIDLYADLFGI-A-GATIGATTSFFD	606
Bth110240	EAGSYDGYKARVADLANRQ-MGGYVAPDGQTEAAVAAIFARMFQV-A-PEAISATASFFD	605
EchA	ESGQYDDVIERVAELTTRR-LGGHTPPEGETERILAGIYAEMFDT-T-PDRISATASFFD	586
	* . :	
TdiA	IGATSMDLVAIHRINKCLQ-PSQPLRLTDILKDDSTARGLAVALATGAAPRSQDQSSTHV	685
AstA	TGATSMDLVAIMHRMNKPLPLAAHPIKLTDLNNPTIRGLSVRIAKLTGALVETDKKPHE	674
AtqA	MGATSMDLVAIMQVRNRQLQ-LRKTALTDMLNYATARGLCQRIAAATSG-----TGRKHV	679
MicA	LGVSSNLNILLRSTLQRMALDP-KIDIPLSIIILNNPTPGAIARSIIDSS-----RSSLAG	660
BtyA	FGITSLDMIWKRQAETILGH---EIPMLAIITSPTIRVLARQLQD--G-----HHGPGE	652
PgnA	LGITSIELLKLKRGIEDLIGH---GQIPLITLMTNPTIRTLSDALKQHAQ-----QRDCSI	666
AtrAAt	LGITSIDLIRLKKSEIEQRDI-DQEIPMTTLMANTTVRELSAALHDLQA-----PGT	641
MelA	VGIDSIELINLKRDIHQHLGFADATIPIIILENTTVRELAAALDNLYR-----PKE	648
ApvA	VGINSVELIRLKRDIEDHLGMAASAIPMIMLMTHSTVRDLATALEKLQG-----PRE	648
AtrA	LGGTSIDVIRLKREGEAHFGL-S-EIPIIQILKNPIVSDLAQVNGLVN----NDASANE	682
Nps3	LGGTSIDVIRLKREGETVFGL-P-EIPIIQILKHPVLRDLAKYIDALVS----KDNTQQE	687
InvA2	LGGTSIDVIRLKREGESAFDL-P-EIPTIQILKHPVISSLAKYVDSLIS----KDASQEE	678
InvA5	LGGTSIDVIRLKREGESAFDL-P-EIPTIQILKHPVISSLAKYVDSLIS----KDASQEE	678
InvA1	LGGTSIDVIRLKREGEAAFDL-P-EIPTIQILKHPVSSLANYI VALKT----KGASAE	684
GreA	LGGTSIDVIRLKREGEAHFGL-P-EIPTIQILKHPVSSLANYI VALLS----KDSQTEE	683
RalA	LGGTSLDIKQLQRLHRQFGA-QAGVSLAVILQNPSPRALAARIDPA-----RRA-HAE	658
Bth110240	LGGTSLDILKLRHVEQRLGV-I-DLPVITVLQNPSVRALAARLAPG-----ERV TAGE	657
EchA	LGGTSLDILRLRRQVHRRLLGV-A-DLPVITVLTAPSVRQLAARLDGG-----GAPGAVA	638
	* * : : . : : :	

Fortführung von Abbildung 7-1

TdiA	YDPVVTLQPHGT-KS	PLWLHVHPGVGEVLVFNLAH-HITDRPVYA	FRAKGFNAAGLPET	743
AstA	YDPVVTLQPNGT-K	TPLWLHVHPGVGEVLVFNLAH-RIRDRPVYA	FRAKGFNAAG--ET	730
AtqA	YDPVVVLQPHGR-K	TPLWLHVHPGVGEVLVFNLAH-HITDRPVYA	FRAKGFNAAG--ET	735
MicA	YNAIVPLQQHRHGGT	PLFCIHGPSGEVLVFNLAH-HFPTRPVYAL	RTRGYGSN----EQ	715
BtyA	YNPVTLPQPHGS-K	TPLWLIHPGGEVLVFNLAH-FIDRPVYGL	RARGFNDRG----EP	707
PgnA	YNPVVVLQSQGK-K	PIIWLHVHPGVGEVMI FNMNLAK-FIIDRPVYGL	RARGFNDRG----ED	720
AtrAAt	YKPVITLQNEGS-K	TPLWLIHPGVGEVLVFNLAH-YIKDRPVYAL	RARGFGAH----ET	695
MelA	YNPVTTLQAHGD-KN	PLWLHVHPGAGEVLIFINLAK-FITDRPVYAL	RARGFDEG----EK	702
ApvA	YDPVVTLQSHGH-KN	PLWLHVHPGAGEVLVFNLAH-YIVDRPVYAL	RARGFNDRG----EQ	702
AtrA	YDPIVPLQLSGD-K	TPIFFVHPGVGEVLIFVNLAKYFQNERPFYA	FRARGFEPG----HP	737
Nps3	YDPIVPLQLTGN-K	TPIFFVHPGVGEVLIFVNLAKYFQNERPFYA	FRARGFEPG----QP	742
InvA2	YDPIVPLQLTGN-K	TPIFMVHPGVGEVLIFVNLAKYFQNERPFYA	FRARGFEPG----HP	733
InvA5	YDPIVPLQLTGN-K	TPIFMVHPGVGEVLIFVNLAKYFQNERPFYA	FRARGFEPG----HP	733
InvA1	YDPIVPLQLTGK-K	TPIFMVHPGVGEVLIFVNLAKYFQNERPFYA	FRARGFEPG----QP	739
GreA	YDPIVPLQLTGN-K	TPIFFVHPGVGEVLIFVNLAKYFQNERPFYA	FRARGFEPG----HP	738
RalA	YDPVVPLQTSGS-K	TPLFCIHGPSGEVLVFNLANFYVNDRPFYAL	RARGFNDRG----ET	713
Bth110240	YDPVVPLQLTGK-K	TPLFCVHPGVGEVLVFNLAH-YFVNERPFYA	RARGFNDRG----ET	712
EchA	YDPVVPLQTGGE-K	TPLFCVHPGVGEVLVFNLAH-YFVGRDPFHAL	RARGFNDRG----EK	693
	*. :. **	*.:. **	***.:. **	**.:.***:*
TdiA	PFTSLEELFTTYRDAIKERQPHGPYAIAG	YSYSGSMVAFEVSKLLEQDG-DEVRYCGSWNL		802
AstA	PFKTLDEVFHTYRDSIKKRQPGPYAIAG	YSYSGSMVAFEIGKLLEAEG-DEVAYCGSWNL		789
AtqA	PFTSLEEVFETYKAAMKARQPGPYAIAG	YSYSGSMVAFEIAKRLEAEG-DEVRYCGSWNL		794
MicA	LFGSIEETVETYATQIRQVQPHGPYAIAG	YSLGSTLAFEVAKVLEAAG-EEVKFLASIDY		774
BtyA	PFSGIHEAADAYYQAIKRVQPHGPYAVAG	YSYGLVAFEVAKRLDQHGKDEVFFGSLIDL		767
PgnA	PFHTFEEIVSTYHASIKEKQPSGPYAIAG	YSYSGAKVAFDIAKALEHNG-DEVRLGLIDL		779
AtrAAt	PFASIEETVRTYAAIKAKQPRGPYAVAG	YSYGTMLAFEVSKQLEQGG-DTVGVFGSEN		754
MelA	PFDSIEDAVTSYNGVKSQPHGPYALAG	YCYGSMLAFEVAKKLEENG-DEVRFVGSSEN		761
ApvA	PFETIEEATASYNGIRSRQPHGPYALAG	YCYGSMLAFEVAKMLESNG-EEVRFVGSSEN		761
AtrA	FFGSMDEMVTSYANAMKKTQPKGPYAIAG	YSYSGVVAFEVAKRLESNG-EEVKFVGLINI		796
Nps3	FFSKMDEMVSYYAAMKRTQPKGPYAIAG	YSYSGVVAFEVAKRLEAGG-DEVKRVGLINI		801
InvA2	FFTTMDEMVSYYAAMKRTQAHGPYAIAG	YSYSGVVAFEVAKRLEAMG-DEVKFTGLINI		792
InvA5	FFTTMDEMVSYYAAMKRTQAHGPYAIAG	YSYSGVVAFEVAKRLEAMG-DEVKFTGLINI		792
InvA1	FFTSMDDEMVSYYAAMKRTQAHGPYAIAG	YSYSGVVAFEVAKRLEAMG-EEVKFTGLINI		798
GreA	FFTSMDDEMVSYYAAMKRTQATGPYAIAG	YSYSGVVAFEVAKRLEAMG-DEVKFTGLINI		797
RalA	HFQSFDELVRTYVTAIRKRQPGPYAIVG	YSYSGVVALEPVAQMLEAAG-EQVAFVGSIDA		772
Bth110240	YFSSFDEMVTYVDAIRKRQPHGPYAVAG	YSYSGVVALEPVAQMLEAAG-ERVDFVGSSEN		771
EchA	PFTSFEEMVECYVEAIRARQPHGPYAVAG	YSYSGVVALEPVAQMLEAAG-ERVDFVGSSEN		752
	* ..: *	:. *	***.:. **	:. :. * *
TdiA	PPHIK-FRMRELVWEECVIHLFYFVGLMTE	LAAAYTHKPTLQEFNRANRRLDAIRYL	RQHC	861
AstA	PPHIK-FRMRELLWDECVIHLFYFVGLMTE	ATAYTHKPTLQCEFNKQGRRLDAIRYL	RQHS	848
AtqA	PPHIK-WRMKQLLWDECI IHLFYFVDLMDEE	TAYTHKPKLCELRQGRRLDAIRYL	RQHS	853
MicA	PPHIA-HYVRDLNWDVLLHIAFFLELIDEK	TMVEVTPYLHTLD--R--QTAL	THILNIG	829
BtyA	PPFHA-QIISKSDWTESLLHLASSLSLIAEEE	INTLGADLRGLP--Q--PRAIQ	KILARA	822
PgnA	PPSLNGTQMRAVAWKEMLLHICRMVGVIREE	GIKKIYPRLEPENISP--RHA	ITETVMGEA	837
AtrAAt	PPHIK-TRMRQLDFTECLLHAYFLALMSEQR	AGELAAAFAGVQPSQ--ERV	LDDEVQNA	811
MelA	PPHIK-MRMRELDWKECLLHAYFLDLITQKRS	RELAVELDGLD--Q--DTILQAI	IDEA	816
ApvA	PPHIK-MRMRELDWKECLLHAYFLDLITQKRS	RELAVELDGLD--Q--DTILQAI	IDEA	816
AtrA	PPHIA-DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKQ	DADLAPTLRPLT-R--KEQ	LEIVWKLS	851
Nps3	PPHIA-DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKQ	DADLAPTLRPLT-R--KEQ	LEIVWKLS	856
InvA2	PPHIA-DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKQ	DADLAPTLRPLT-R--KEQ	LEIVWKLS	847
InvA5	PPHIA-DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKQ	DADLAPTLRPLT-R--KEQ	LEIVWKLS	847
InvA1	PPHIA-DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKQ	DADLAPTLRPLT-R--KEQ	LEIVWKLS	853
GreA	PPHIA-DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKQ	DADLAPTLRPLT-R--NEQ	LEIVWKLS	852
RalA	PPVIK-HPRGKVDVESALMLAFLSLIDRSQID	ALPERLRATQPH--KDP	CYLFETIA	828
Bth110240	PPHIK-YRMDELDEVEGAVNLAFFLSLIDKQ	QSLTLPPLRAAMPE--QD	PLAYLIDHA	827
EchA	PPHIK-YRMDELDFIETATNLAFFLDLVNKKQ	SLELPAELRPLS-Q--EEQ	LARLLRIA	807
	**	:	:	:

Fortführung von Abbildung 7-1

TdiA	DAARWDELGLSEEEYLLWC-----MDVFVADPLSHVAKDRIDWV	900
AstA	DAARWDELGLSEEEYLLWVGLASNMQGLAVDYEPSGNVNSMDIFVADPLSHVAKDRKDWI	908
AtqA	NPARWDELGLSEEEYLLWVNLAGSNMQGMATEYEP SGNVKHLDFVADPLTHVARTREEWV	913
MicA	DAERARALAI DT KHLGLISDAENFRVNVKTYK PQGKVQHLDVFVADPPTYAARDRKDWR	889
BtyA	PPRRIRELDLSPDGLMRWTKLTSAMAQATRGYVPVGQTRSDVVFYTEPSGALATTRDEWL	882
PgnA	DVTRLAELGLTASALERWANLTHALQRCIVDHKTNGSVAGADAFYCDPMASMAISNEQWA	897
AtrAAt	DPVRLAELQLSRQYLLQWANLAFALQSMADVDP SGSVARMDVFYCVPLAVAAASKQRWR	871
MelA	DKERYAQLSLSRPFLSRWADVAYELHRIAGDYDPDGRVASMDVFFSIPLAIAAASKSEWR	876
ApvA	NMERYAELSLNRPLLVRWADVAYELHRMAFDYDPAGCVAGMDVFFSIPLAIAAASKTEWR	876
AtrA	PPERVTELQLTTPGKLDHWVSIAGSLIECGKSYNPGGNVSAVDVFYAIPLK---GSKEDWL	908
Nps3	PPERLVELQLTPEKLDHWVDIAGSLIECGKDYNP SGSVAVADV FYAIPLR---GSKSDWL	913
InvA2	PPERLVELQLTPEKLDHWVDIAGSLIECGKTYEPASSVSVLDVFYAIPLR---GSKEDWL	904
InvA5	PPERLVELQLTPEKLDHWVDIAGSLIECGKTYEPGSSVSVLDVFYAIPLR---GSKEDWL	904
InvA1	PPERLVELQLTPEKLDHWVDIAGSLIECGKEYNP SGSVSALDV FYAIPLR---GSKEDWL	910
GreA	PPERLVELQLTTPGKLDHWVDIAGSLIECGKDYNP SGSVSAVDVFYAIPLR---GSKADWL	909
RalA	PPERLVELDLDPKFRKAWAALALSLSDIGQAYTPSGSVDSITVFYADPLW---GSKQAYL	885
Bth110240	PPGRLVELDLDPKFRWAGLAQSLTLGRSYAPSGSVRAMSIFYAIPLR---GTKDDWL	884
EchA	PPARLDELDDLKFTAWAELAHGLTTLGRDHYHPSGTTTRSMTVFYAIPLR---GTKEDWL	864
	* * :	

TdiA	EGRLSAWKEFVREDVRFHDVQGAHYTMLNREYVEAFA GTLKNVLRERGL-----	949
AstA	ETRLSAWKDFVRTEVRFHDVQGAHYTMLNPEYVANFAETLRRVLRERGL-----	957
AtqA	NGLLAAWKDFVREGVRYHHVVEGAHYTMLKPEYVANFAKTLRTVLRERGV-----	962
MicA	ENKLGRWVDFCETKVEFHDCPGIHA KMLNREHIAGFAKVFKAA MRRRGV-----	938
BtyA	DRH-REWRQFGRLETQFHPLEGLHYRLMDEDNVHKVYRVLSRAMDARGL-----	930
PgnA	CDYIGKWSDHTRSPRFHHIAGTHYTLDAENIFSFQKTFLRALNDRGI-----	946
AtrAAt	EEHLSQWRDFTRSEPRFHDVQGAHYTMLAPEHVFGFQKTLRGALARGI-----	920
MelA	NVHLSQWDDFTRSHVRFHDVPGEHYSMIGPEHVFAFQKILRSALAE RGM-----	925
ApvA	NVHLSQWEDFTRTVPKFHDVAGEHYSMIGPDHVSFQKTLRKALDERGM-----	925
AtrA	NKQLKPWSQFSRGEPQFIDVPGQHYTLMDFDHVPQFQKIFRGRLEARGL-----	957
Nps3	NNQLKPWSGFSRTEPAFTDVPGRHYTLMDFDHVPQFQKIFRSRLEARGV-----	962
InvA2	NNQLKPWAGYSRAEPSYTDVPGQHYTLMDFDHVPQFQKIFRSRLEARGL-----	953
InvA5	NKQLKPWAGYSRAEPSYTDVPGQHYTLMDFDHVPQFQKIFRSRLEARGL-----	953
InvA1	NKQLKPWEEFSRGATS YTDVPGQHYTLMDFDHVPQFQKIFRSRLEARGL-----	959
GreA	NNQLKPWSGFSRGDASYTDVPGQHYTLMDFDHVPQFQKIFRGRLEARGL-----	958
RalA	KHELKRWDQLTRSPNRYIEVAGEHHTMLDPRHVASFQAVLRAELDRVLGDAA-----	937
Bth110240	NKELRRWDEFTRAPNRYIDVAGEHYTLMGPAHVATFQAVLRAELDRALGK-----	935
EchA	ANELRRWDDYTTEPNRYLDVPGEHY TLMGPRHVAAFQAVLRRELDRA LDDADRARTTGRS	924
	* : * * :: : . : :	

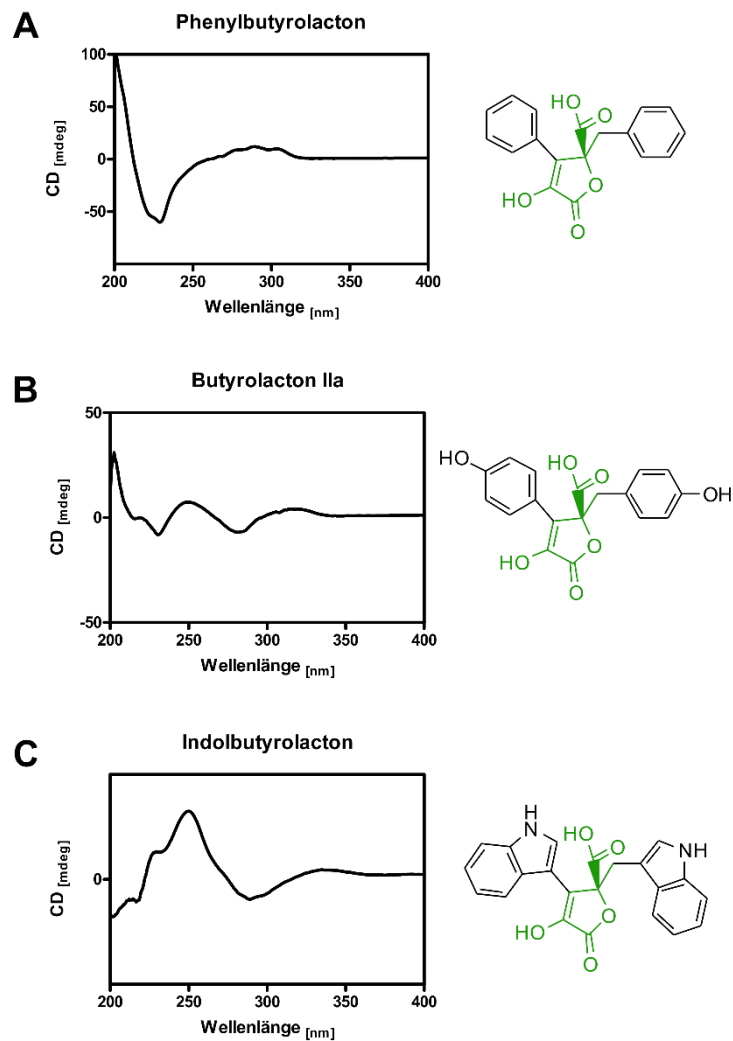


Abbildung 7-2: Zirculardichroismus Spektren von A) Phenylbutyrolacton, B) Butyrolacton IIa und C) Indolbutyrolacton

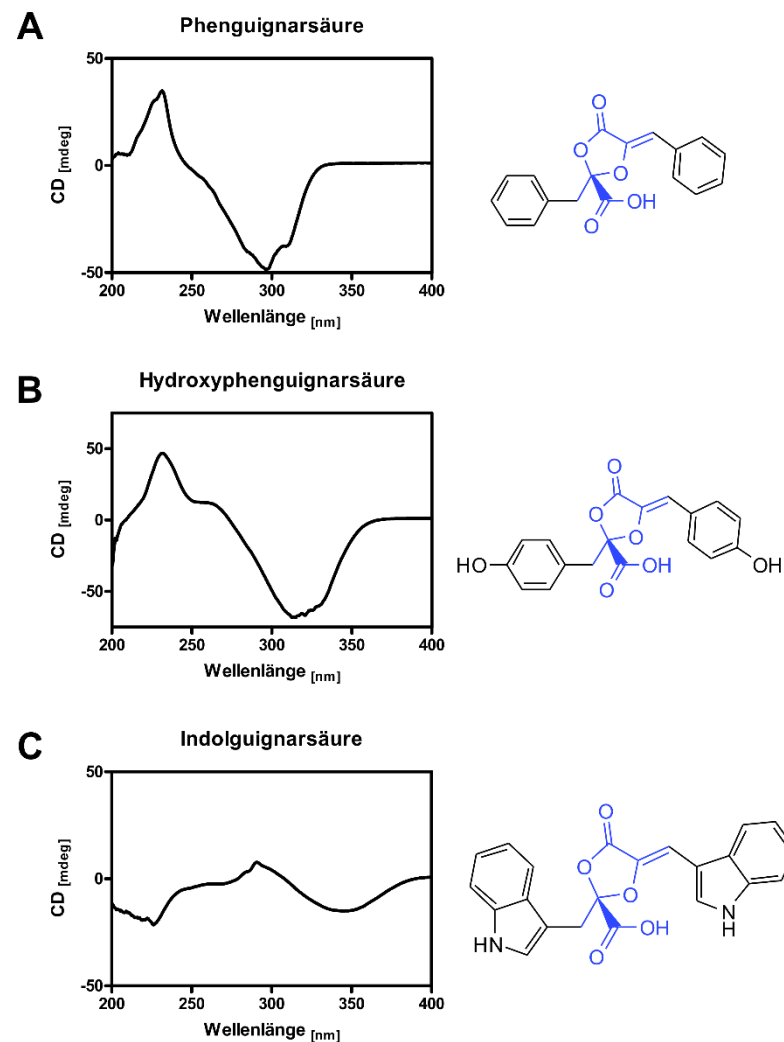
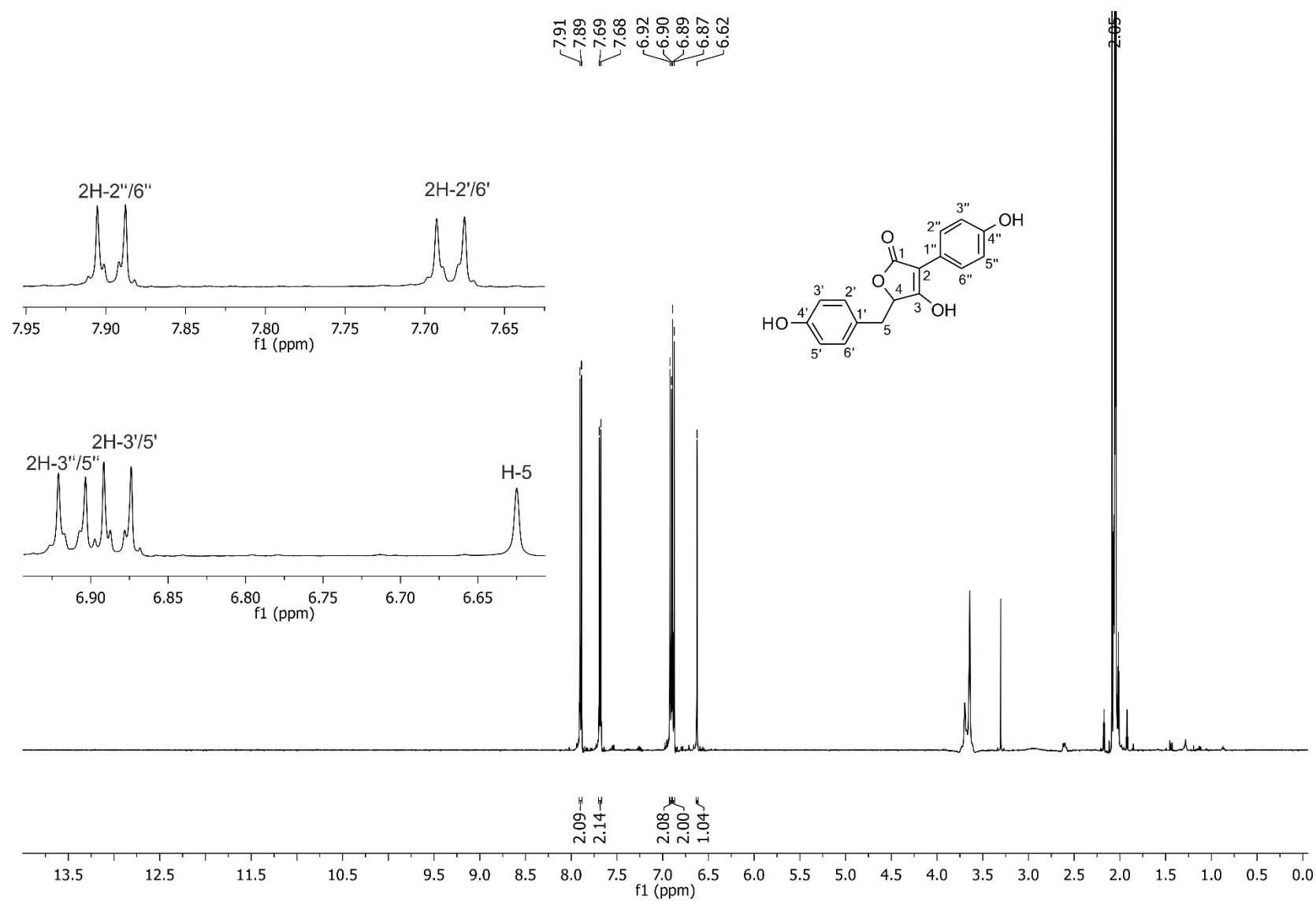
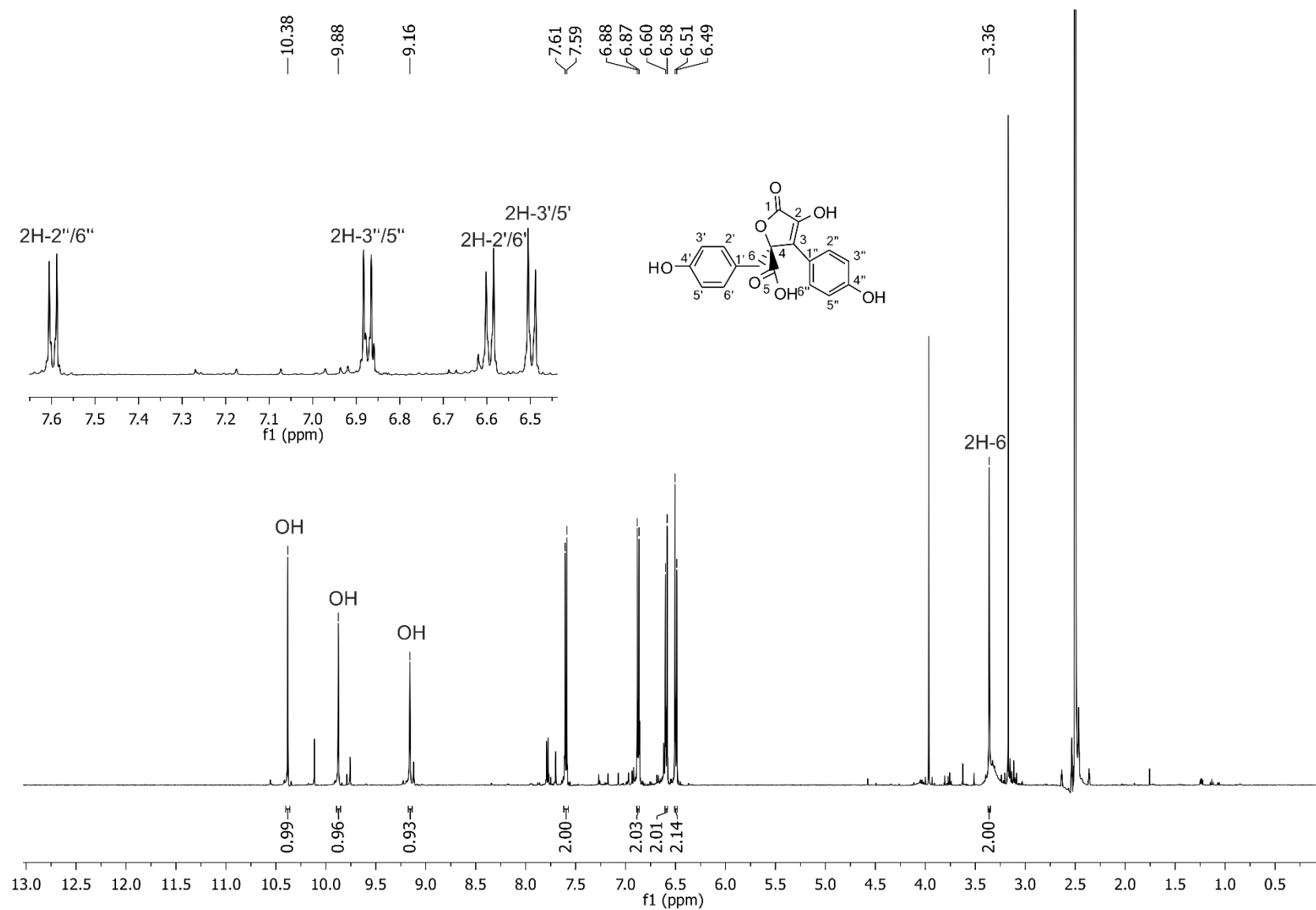
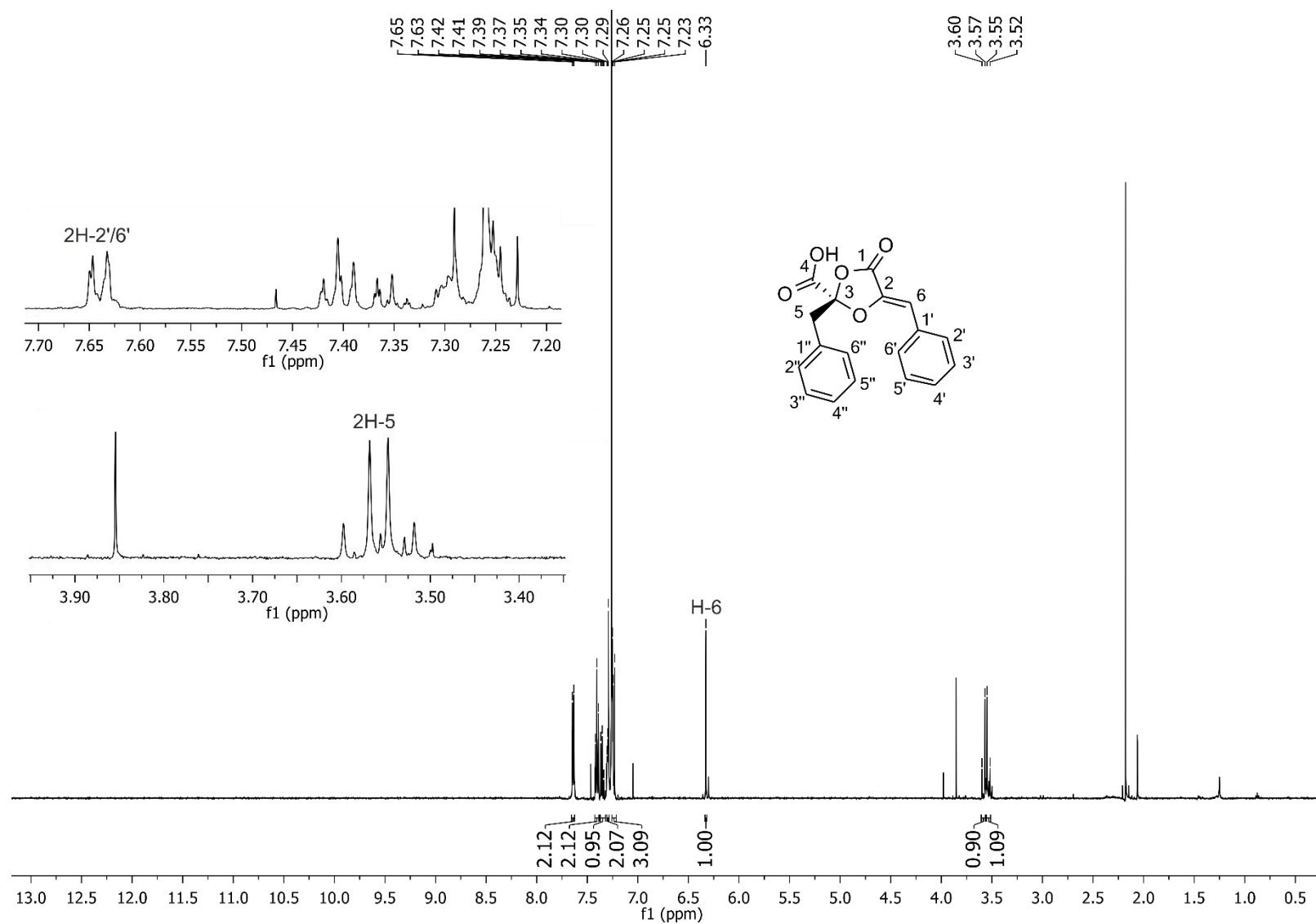
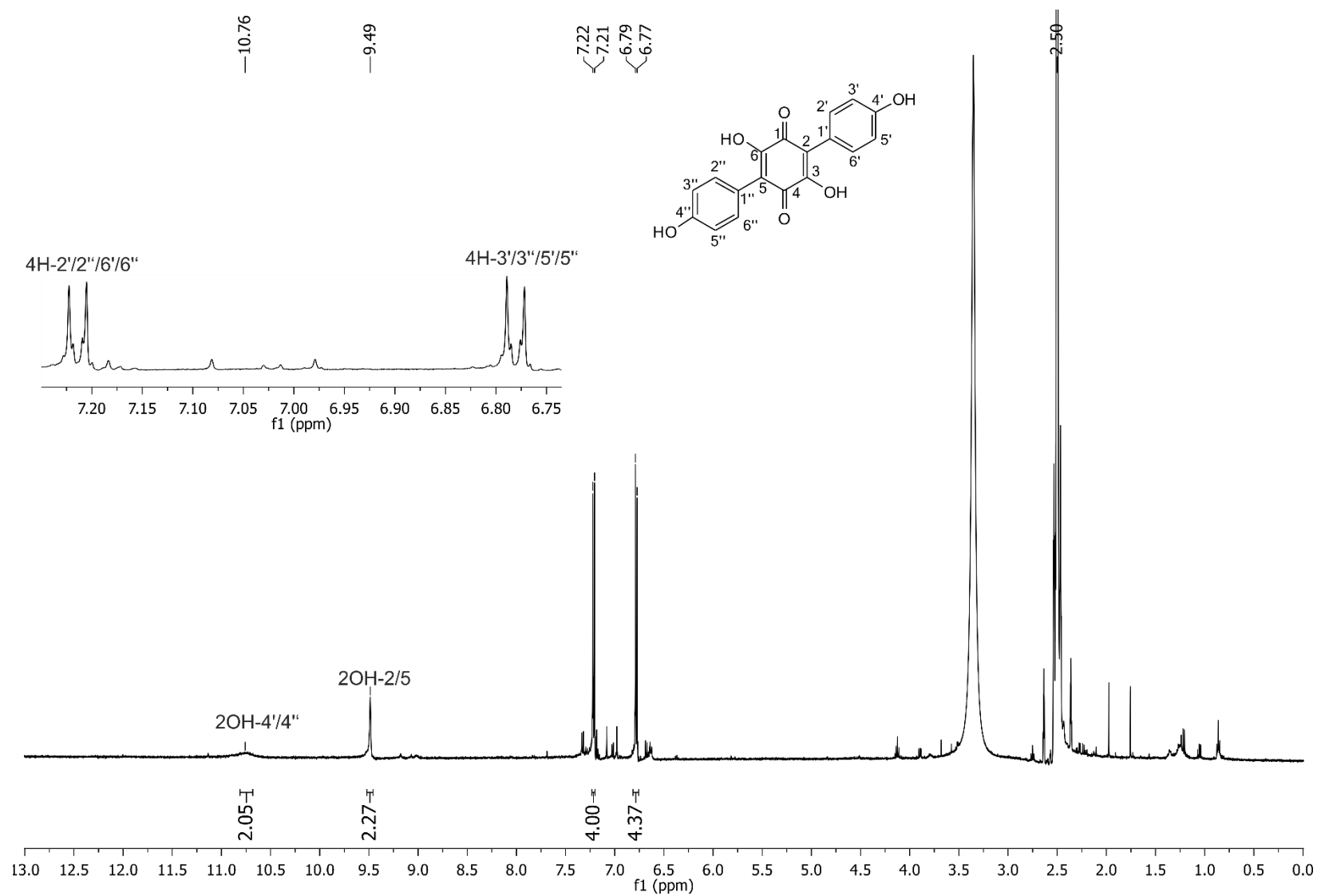


Abbildung 7-3: Zirculardichroismus Spektren von A) Phenguignarsäure, B) Hydroxyphenguignarsäure und C) Indolguignarsäure

Abbildung 7-4: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Aspulvinon E in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Abbildung 7-5: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Butyrolacton IIa in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Abbildung 7-6: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Phenguignarsäure in CDCl_3

Abbildung 7-7: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Atromentin in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

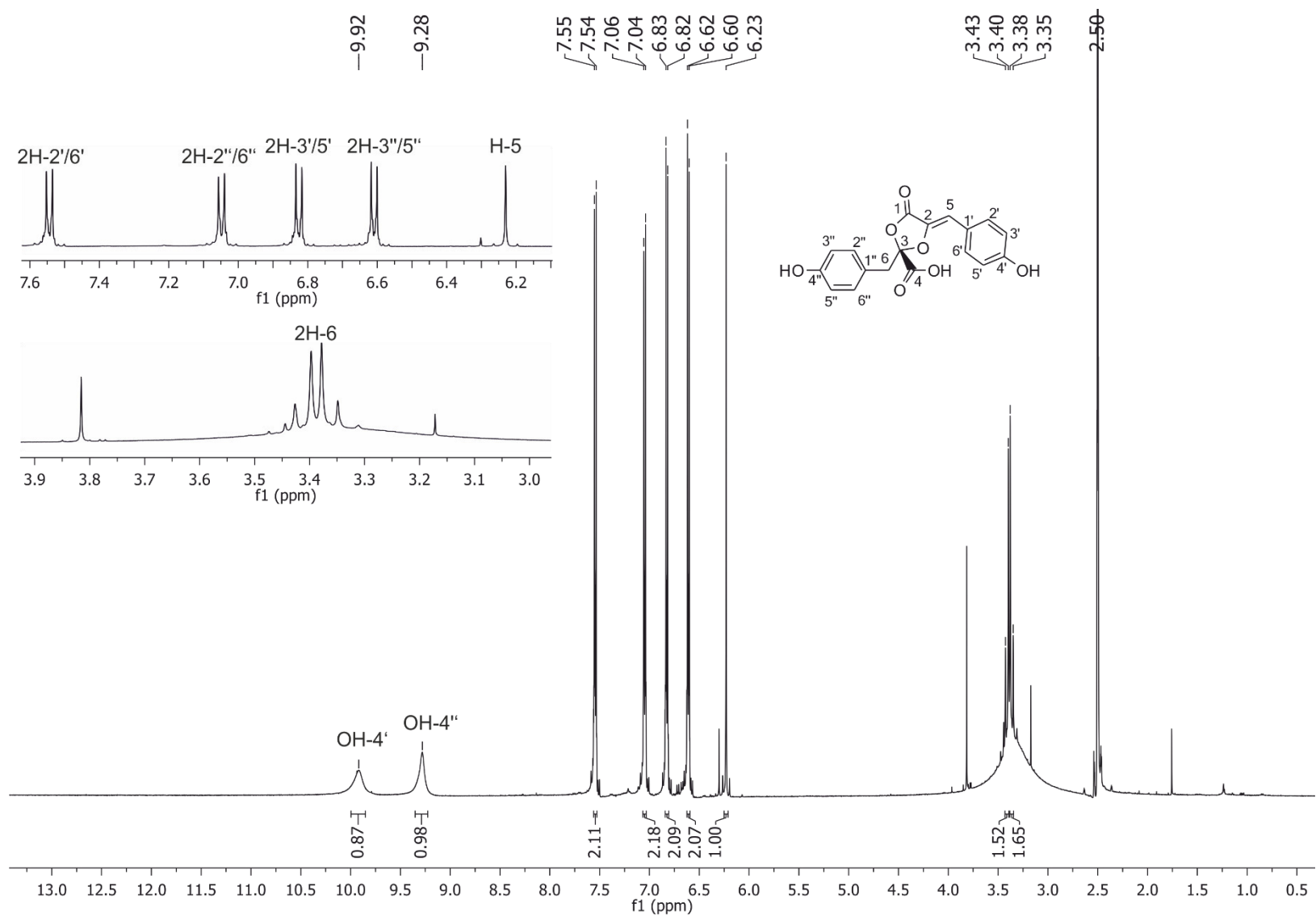
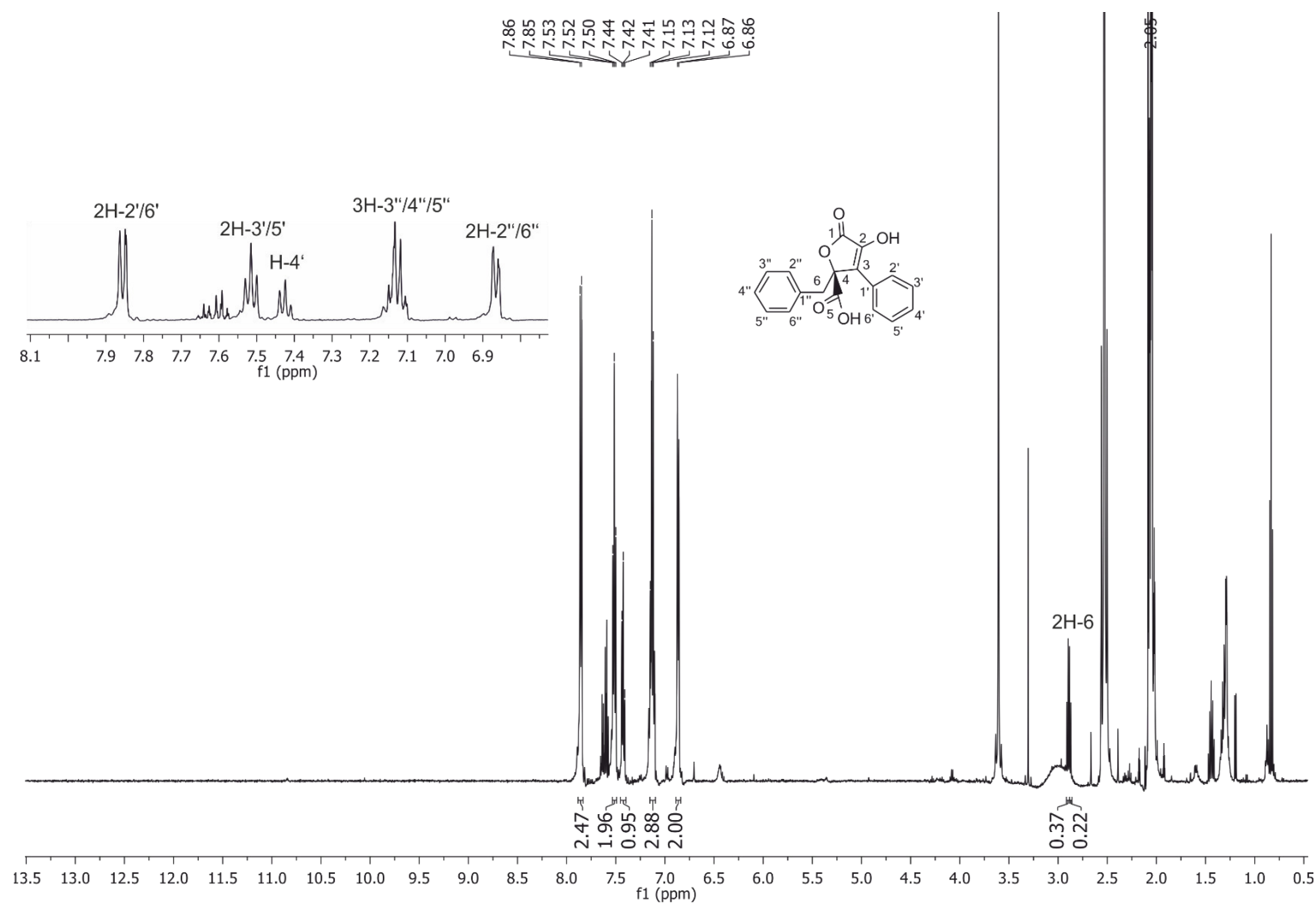
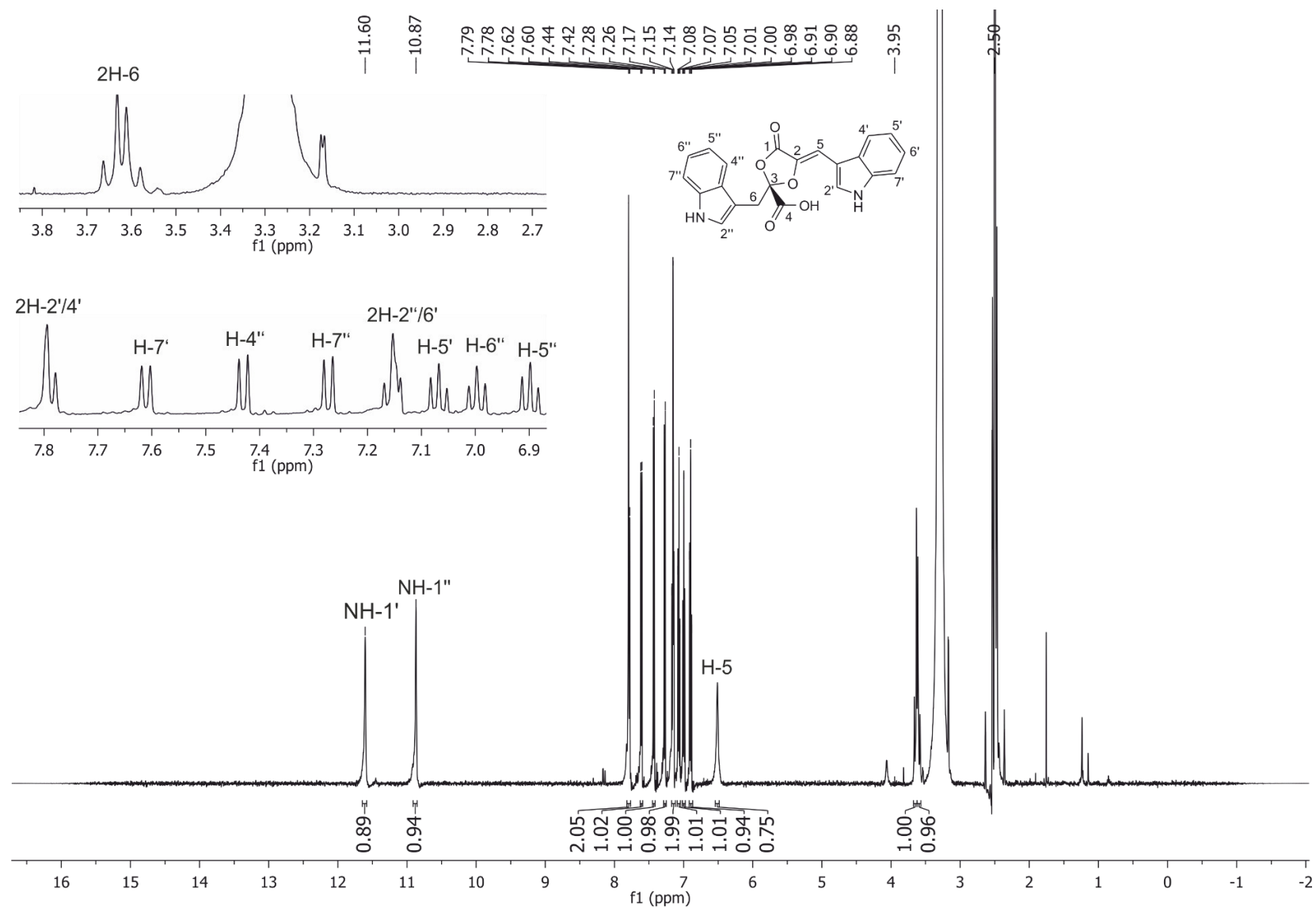
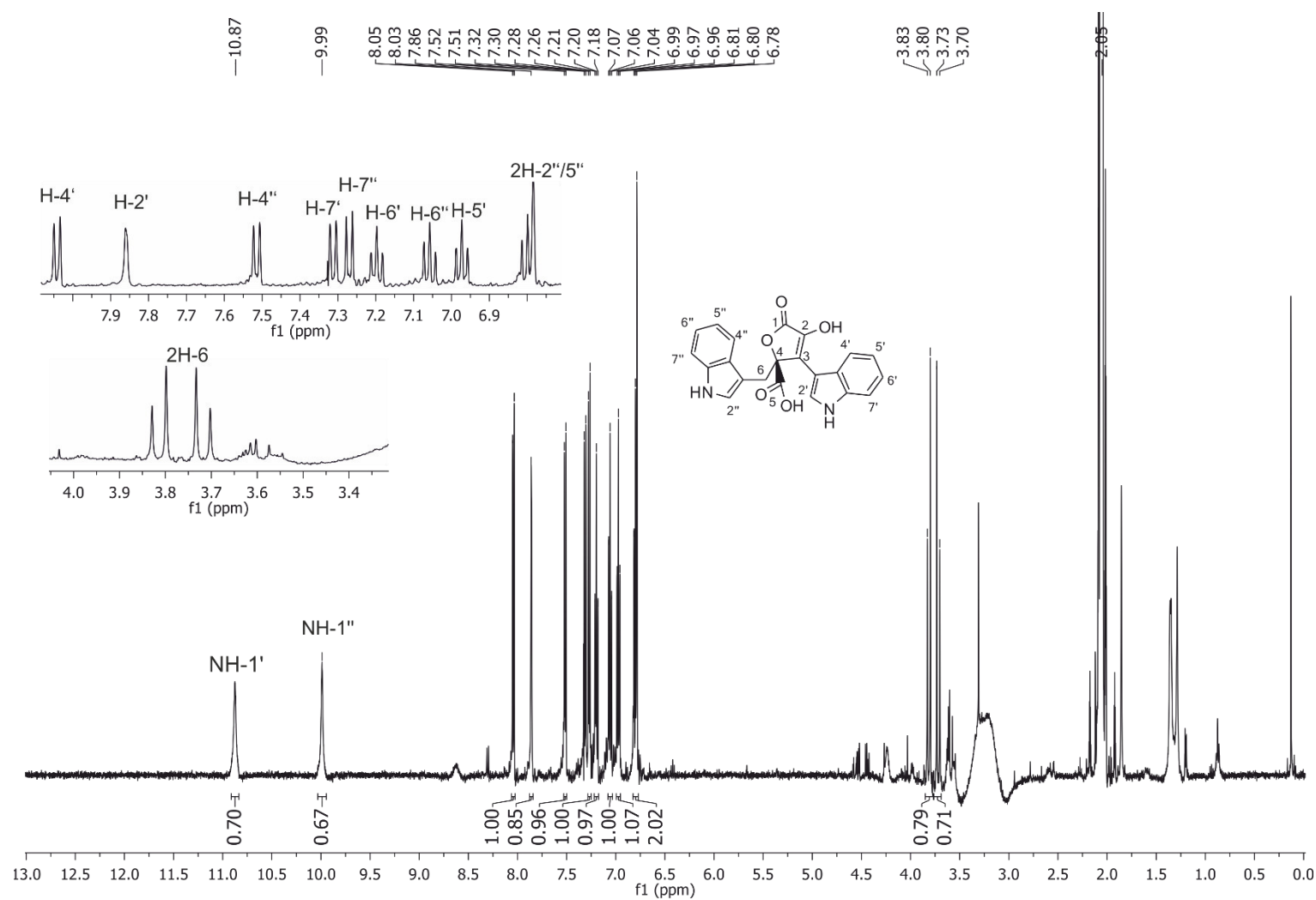


Abbildung 7-9: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Hydroxyphenygnarsäure in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Abbildung 7-10: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Phenylbutyrolacton in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Abbildung 7-11: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Indolguignarsäure in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Abbildung 7-12: ^1H -NMR Übersichtsspektrum von Indolbutyrolacton in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während meiner Promotionszeit. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen und konstruktive Ideen für Probleme geben. Außerdem danke ich ihm, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, bei meinem Forschungsaufenthalt auch die Kultur in Japan näher kennenzulernen.

Prof. Dr. Keusgen danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Bünemann und Prof. Dr. Keck für Ihre Bereitschaft an der Prüfungskommission teilzunehmen.

Herrn Newel und Frau Zitzer danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und die kompetenten Erläuterungen zu jeder Zeit. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Rixa Kraut und Lena Ludwig-Radtke für die Durchführungen der LC-MS-Messungen und die umfangreichen Ratschläge für die sie jederzeit im Laboralltag einen Moment entbehren konnten. Für die hilfreichen Ratschläge bei dem Umgang mit den Hefen gilt mein besonderer Dank Katja. Weiterhin möchte ich Katja sowie auch Johanna und Kristin für die Herstellung des KO3 Hefestammes danken.

Allen meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie danke ich für die sehr freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen Feste und zahlreichen lustigen Momente innerhalb und außerhalb des Institutes. Meiner Bürotruppe Basti, Jonas, Kristin und Julia danke ich für manche Tasse Tee (oder Kaffee) und die auflockernden Momente am Schreibtisch. Ein besonderer Dank gilt auch der „Spieleabend-Gruppe“ mit Lindsay, Nina, Kristin und Flo durch die „sieben Weltwunder“ eine ganz neue Bedeutung erlangt haben. Selbstverständlich geht ein Dank auch an alle anderen Laborkollegen für etwaiges knobeln an Fragestellungen und die unvergessliche Zeit: Lena, M, Linus, Liujuan, Ge, Huomiao, Jing, Jinglin, Jie, Kang, Huili, Aili, Viola, Mike, Carsten, Kathrin, und Peter, thanks for everything!

Thank you Ryouke for the great time in Kyoto and Tokyo during our scientific exchange. I will never forget this exceptional experience.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und Freunden für die Unterstützung und Förderung der letzten Jahre bedanken. Insbesondere meiner Mama danke ich für ihre unerschöpfliche Geduld und die liebevolle Unterstützung.